



**Universidad Nacional de San Martín (UNSAM)
Instituto ANLIS “Dr. Carlos Malbrán”**

Tesis para optar al título de Magister en Microbiología Molecular

**IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS AMBIENTALES,
AISLADAS DE DISTINTAS FUENTES DE AGUA, MEDIANTE
ANÁLISIS DE PATRONES DE RESTRICCIÓN Y SU
COMPARACIÓN CON MÉTODOS FENOTÍPICOS**

AUTOR: TORTONE, CLAUDIA ANDREA

DIRECTOR: M.V. M.Sc. DELIA SUSANA ORIANI

CODIRECTOR: Ph.D. MARTÍN JOSÉ ZUMÁRRAGA

2013



Esta tesis es presentada como parte de los requisitos para optar por el grado académico de Magister en Microbiología Molecular, de la Universidad Nacional de San Martín y ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título.

Contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa y en el Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA Castelar, Buenos Aires.

A Nico, Agustín y Alejo.

A mis padres.

AGRADECIMIENTOS

A Susana por brindarme su confianza, apoyo incondicional y estímulo en todo momento, sin perder nunca su cálida condición humana. Siempre le estaré agradecida por sus conocimientos científicos y valores transmitidos.

A Martín por su colaboración desinteresada y transmisión de conocimientos que facilitaron mi incursión en la práctica de la Biología Molecular y que sin su ayuda no podría haber concretado este trabajo.

A la Secretaría de Ciencia, Técnica y Posgrado de la Facultad de Ciencias Veterinarias y a la UNLPam, por su permanente apoyo económico para la realización de esta maestría.

A Andrea por su constante colaboración y valiosas sugerencias.

Al Instituto de Biotecnología - CICVyA, INTA Castelar, por el apoyo recibido y permitirme trabajar allí.

A mis compañeras de trabajo, Sandra, Valeria, y a las “dos” Marisas por brindarme su amistad, cooperación y por las experiencias compartidas.

A mi familia, Nico, Agus y Ale, que me bancaron en todo este tiempo. Soportaron mis ausencias por los viajes frecuentes y las horas de lectura frente a la notebook. ¡Gracias por la paciencia y la comprensión!

ABREVIATURAS

ADE: agua destilada estéril
ADN: ácido desoxirribonucleico
AG: arabinogalactano
BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*
CG: *Gas Chromatography*
CORPICO: Cooperativa Regional de Electricidad, de Obras y otros servicios de General Pico
CPA: célula presentadora de antígeno
DAT: diaciltrealosa
DIM: fenolfthiocerol dimycocerosato
FNT- α : factor de necrosis tumoral alfa
GPLs: glicopéptido lípidos
HIV: Virus de la Inmunodeficiencia Humana
HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*
ITS: región intergénica
 γ -INT: gamma-interferón
LAM: lipoarabinomanano
LM: lipomanano
MA: micobacterias ambientales
MAC: Complejo *Mycobacterium avium*
MAIS: complejo *Mycobacterium avium intracellulare scrofulaceum*
Man: manosa
MNT: Micobacterias no tuberculosas
MOTT: *mycobacteria other than tuberculosis*
PAT: poliaciltrealosa
pb: pares de bases
PCR: *polymerase chain reaction*
PGL: glicolípidos fenólicos
PIM: fosfatidil-*myo*-inositol manósidos
PknG: proteinquinasa G
PLC: fosfolipasa C
PLD: fosfolipasa D
PRA: *PCR-restriction enzyme analysis*
PVC: Policloruro de vinilo
rARN: ácido ribonucleico ribosomal
RD1: locus *Region of Difference 1*
RFLP: *restriction fragment length polymorphism*
RIDOM: Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms
RRU: Reciclado de Residuos Urbanos
SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Humana
SL: sulfolípidos
TAE: Tris acetato EDTA
TBE: Tris Borato EDTA
TDM: dimicolato de trealosa
TLC: *Thin-Layer Chromatography*
T7SS: sistema de secreción tipo 7
WHO: *World Health Organization*

ÍNDICE

1	RESUMEN.....	3
2	INTRODUCCIÓN.....	4
2.1	Generalidades.....	4
2.2	Clasificación de las micobacterias.....	7
2.3	Composición y arquitectura de la envoltura celular micobacteriana.....	10
2.4	Factores de virulencia.....	13
2.4.1	Componentes de la envoltura celular.....	14
2.4.1.1	Glicopeptidolípidos (GPLs).....	14
2.4.1.2	Lipomananos y Lipoarabinomananos.....	15
2.4.1.3	Acidos micólicos.....	16
2.4.1.4	2,3-Di-O-aciltrehalosa (DA)T.....	17
2.4.2	Micolactonas.....	18
2.4.3	Fosfolipasas.....	19
2.4.4	Inhibición de la formación del fagolisosoma.....	19
2.4.5	Escape del fagosoma.....	20
2.5	Micobacteriosis.....	21
2.6	Hábitat de las MA.....	24
2.7	Métodos fenotípicos y moleculares de identificación de las MA.....	30
2.7.1	Métodos fenotípicos.....	30
2.7.2	Métodos moleculares.....	31
2.7.2.1	Hibridación con sondas de ADN.....	31
2.7.2.2	Hibridación reversa.....	31
2.7.2.3	Secuenciación de un fragmento del gen 16S rARN.....	32
2.7.2.4	Secuenciación del gen <i>hsp65</i>	33
2.7.2.5	PRA (PCR-Restriction Enzyme Analysis).....	34
3	HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....	35
3.1	Hipótesis.....	35
3.2	Objetivo general.....	35

3.3	Objetivos específicos.....	35
4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
4.1	Muestreo.....	35
4.2	Descontaminación específica para las micobacterias.....	39
4.2.1	Muestras de agua de humedales y fuentes públicas arquitectónicas.....	39
4.2.2	Muestras de agua de red.....	40
4.3	Aislamientos estudiados y cepas.....	40
4.4	Medios y condiciones de cultivo.....	40
4.5	Caracterización fenotípica.....	40
4.6	Método PRA (PCR-Restriction Enzime Analysis).....	41
4.7	Secuenciación del gen <i>hsp65</i> y un fragmento del gen 16S rARN.....	42
5	RESULTADOS.....	44
5.1	Identificación de MA mediante pruebas bioquímicas.....	44
5.2	Identificación de MA por PRA (PCR-Restriction Enzime Analysis).....	48
5.3	Identificación de MA por secuenciación de un fragmento del gen16S rARN.....	56
5.4	Identificación de MA por secuenciación del gen <i>hsp65</i>	60
5.5	Posibles nuevas variantes alélicas expresadas en nuevos patrones PRA.....	64
5.6	Biodiversidad de MA en agua de red, fuentes arquitectónicas públicas de la ciudad de General Pico, La Pampa, y en humedales de la zona de influencia.....	66
6	DISCUSIÓN.....	68
7	CONCLUSIONES.....	75
8	BIBLIOGRAFÍA.....	76
	ANEXO 1: Recomendaciones.....	87
	ANEXO 2: Medios de cultivo y soluciones.....	89
	ANEXO 3: Pruebas bioquímicas.....	91
	ANEXO 4: Ilustraciones.....	101

1. RESUMEN

Gran parte de las micobacterias ambientales (MA) son consideradas patógenas oportunistas responsables de micobacteriosis tanto en huéspedes inmunocomprometidos como inmunocompetentes. No existe evidencia de transmisión directa entre individuos siendo el medio ambiente la fuente de infección. En muchos laboratorios se ha reemplazado la identificación bioquímica de las MA por nuevas técnicas moleculares rápidas y menos complejas que la tipificación clásica. Entre los métodos moleculares el PRA (PCR-*Restriction Enzyme Analysis*) se ha descrito como una técnica de rutina capaz de ser implementada en los laboratorios de baja complejidad. El objetivo principal de este trabajo fue valorar la utilidad de la técnica del PRA en la tipificación de MA recuperadas de muestras de agua. A los 56 aislamientos obtenidos, provenientes de humedales, agua de red y de fuentes arquitectónicas públicas, inicialmente se los identificó mediante pruebas bioquímicas y el análisis de los patrones de restricción, obteniéndose una concordancia del 48,21%. Posteriormente se les realizó secuenciación de un fragmento de los genes 16S rARN y *hsp65*. El PRA resultó ser más preciso cuando se lo comparó con los resultados obtenidos por secuenciación del gen *hsp65* que cuando se los contrastó con la secuenciación del fragmento 16S rARN, obteniéndose una concordancia del 50% y 35,71%, respectivamente. El PRA es una técnica rápida y fácil de implementar a diferencia de las pruebas bioquímicas, siendo necesario recurrir a técnicas moleculares complementarias, específicamente cuando se desea identificar a aquellos aislamientos de origen ambiental que presentan colonias pigmentadas y de rápido crecimiento, así como también cuando se evidencian posibles nuevos patrones de restricción. Las pruebas bioquímicas son de gran utilidad para respaldar los datos obtenidos por técnicas moleculares, principalmente en aquellos casos en los cuales por sí solos, tanto uno u otro método, no pueden definir la especie de *Mycobacterium* aislada. Las distintas fuentes de agua estudiadas constituyen un importante reservorio de MA, posibles patógenas oportunistas, de importancia para la salud pública.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Generalidades

El género *Mycobacterium* es el único dentro de la familia *Mycobacteriaceae*. La posición filogenética determinada por la secuenciación del gen 16S rARN establece que pertenece al suborden *Corynebacterineae* y orden *Actinomycetales*. El género *Mycobacterium* está constituido por bacilos rectos o ligeramente curvos (de 0,2-0,6 x 1,0-10 µm), aerobios y microaerófilos, los cuales se caracterizan por ser ácido alcohol resistentes en alguna etapa de su crecimiento. Son inmóviles y asporógenos, no producen conidios ni hifas aéreas visibles. Se caracterizan por un alto contenido de guanina más citosina (G+C=57-73%) en el ADN y un alto contenido de lípidos en la pared, probablemente el más elevado entre todas las bacterias (Whitman *et al.*, 2012).

La presencia de ácidos micólicos en la pared celular distingue al género. Estos lípidos característicos de alto peso molecular (60-90 átomos de carbono) pueden actuar como fuentes de reserva de carbono y energía. Los lípidos constituyen más de la mitad del peso seco de las micobacterias, sin embargo la composición lipídica del bacilo puede variar durante el ciclo de vida en un cultivo, dependiendo de la disponibilidad de nutrientes (Whitman *et al.*, 2012). La capa cerosa confiere las características propias del género: ácido-alcohol resistencia, hidrofobicidad, resistencia a injurias y a varios antibióticos, además de distintivas propiedades inmunológicas. Es probable que también contribuya a la lenta tasa de crecimiento de algunas especies mediante la restricción de la absorción de nutrientes (Barrera, 2007).

El Manual de Bergey, volumen V presenta una lista de 129 especies y subespecies, entendiéndose que son aquellas descritas hasta el momento de su publicación (Whitman *et al.*, 2012), ya que nuevas especies son caracterizadas día a día por los micobacteriólogos. El estado taxonómico de nuevos miembros del complejo es aun incierto (ver DSMZ, http://www.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature.php y LPSN, <http://www.bacterio.cict.fr>) y en algunos casos la asignación de determinadas especies ha sido cuestionada (Barrera, 2007).

La mayoría de las especies de micobacterias pueden ser clasificadas de acuerdo a su velocidad de crecimiento en 2 grupos taxonómicos. Las especies de lento crecimiento son aquellas que requieren más de 7 días de incubación a temperatura óptima para producir

colonias fácilmente visibles, a partir de un inóculo altamente diluido. Contrariamente, las especies de rápido crecimiento son aquellas que sus colonias son visibles en menos de 7 días, bajo condiciones comparables (Whitman *et al.*, 2012).

Hay una asociación entre el número de operones ribosomales y la velocidad de crecimiento de las cepas de micobacterias. Las cepas de rápido crecimiento comúnmente tienen dos operones (*rrnA* y *rrnB*), mientras que las cepas de lento crecimiento usualmente tienen sólo uno (Bercovier *et al.*, 1986). El operón de micobacterias está compuesto por una región líder, un gen 16S rARN, el espaciador intergénico 1 (ITS-1), un gen 23S rARN, ITS-2, y un gen 5S rARN. Los tamaños de la región líder y regiones espaciadoras varían entre las micobacterias rápidas y lentas (Ji *et al.*, 1994). Este estudio permitió proponer que las especies de lento crecimiento se separaron de una línea filogenética principal luego de la delección del operón *rrnB*, dejando al operón similar al *rrnA* como la única fuente de rARN. Las regiones líder y espaciadoras del operón *rrn* están altamente conservadas y son útiles en la evaluación de las relaciones filogenéticas entre especies de micobacterias. (Whitman *et al.*, 2012)

El crecimiento celular de estas bacterias es lento o muy lento con un tiempo de generación de 2 horas a más de 20 horas. El período de incubación puede ser de sólo unos pocos días a más de 8 semanas, para poder visualizar colonias a partir de un inóculo diluido sobre un medio sólido a temperatura óptima, la cual puede variar ampliamente de acuerdo a la especie, ya sea por debajo de la temperatura ambiente oscilando hasta temperaturas superiores a 45°C (Whitman *et al.*, 2012).

Las micobacterias forman distintos tipos de colonias, así es que *M. intracellulare* presenta usualmente colonias lisas en su aislamiento primario desde una muestra clínica, mientras que *M. fortuitum* y *M. xenopi* pueden parecer miceliales en estadíos tempranos de crecimiento, aunque las colonias más viejas exhiben extensiones filamentosas ramificadas que se fragmentan dando formas bacilares o cocoides cuando se prepara un extendido. Las colonias pueden ser o no pigmentadas. Algunas cepas producen pigmentos de composición carotenóide en presencia o ausencia de luz, presentándose como colonias amarillas a naranjas (raramente rosas). Se denominan especies escotocromogénicas cuando dichos pigmentos se producen en ausencia de luz y fotocromogénicas cuando sólo se producen en presencia de luz (Whitman *et al.*, 2012).

La mayoría de las micobacterias son aerobias obligadas, aunque algunas especies son aerotolerantes. En algunas ocasiones suele utilizarse una atmósfera aerobia suplementada con dióxido de carbono para estimular el crecimiento. Las micobacterias muestran variaciones considerables en cuanto a los sustratos usados como fuentes de carbono y nitrógeno. Tales variaciones pueden ser tenidas en cuenta para la identificación de especies. A pesar de que pueden crecer en medios simples presentan un mejor desarrollo en medios a base de huevo como el medio Löwenstein-Jensen (Jensen, 1932; Löwenstein, 1931) y otros como el medio Middlebrook (Lorian, 1968). Algunas especies necesitan medios de cultivo suplementados, tal es el caso de *M. haemophilum* que requiere 0,4% de hemoglobina o 60µM de hemina (Sompolinsky *et al.*, 1978). El metabolismo de las micobacterias es común a otras bacterias, la mayoría utilizan como fuente de carbono el glicerol como un constituyente común en los medios de cultivo, metabolizándolo a piruvato, con excepción de *M. bovis* que desarrolla mejor si el medio contiene directamente piruvato como fuente de carbono (Stonebrink, 1958). De manera similar la asparagina es una fuente de nitrógeno preferencial que es adicionada en muchos medios de cultivo estándares para micobacterias.

La adquisición de hierro en ambientes donde dicho elemento se encuentra en muy bajas concentraciones es vital para la mayoría de las bacterias, por ello la competición exitosa entre las proteínas transportadoras de hierro del huésped y el microorganismo invasor es considerado un factor de patogenicidad. Las micobacterias poseen dos tipos de sideróforos (o agentes quelantes de hierro): exoquelinas, las cuales son secretadas al exterior y las micobactinas que están unidas a la pared celular (Ratledge, 1984). Las micobactinas son compuestos de hidroxamato producidos por todas las micobacterias a excepción de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Bergey *et al.*, 1923). Para el cultivo de esta especie es necesario entonces incorporar micobactina al medio utilizado.

Es de destacar que *M. leprae* no ha podido ser cultivado fuera de células vivas, parece ser que es un parásito intracelular obligado carente de muchos genes necesarios para la supervivencia independiente (Whitman *et al.*, 2012).

Cuando se intenta recuperar micobacterias desde muestras clínicas y/o ambientales es necesario inhibir la flora acompañante por medio de un proceso de descontaminación. Para ello se utilizan agentes químicos que selectivamente actúan como bactericidas de los

microorganismos no ácido-alcohol resistentes. Dichos agentes por lo general, son ácidos o álcalis diluidos, con o sin compuestos de amonio cuaternario. El tiempo de exposición a los agentes decontaminantes debe ser cuidadosamente controlado ya que la resistencia de las micobacterias no es absoluta (Whitman *et al.*, 2012). Luego de la decontaminación la muestra se siembra en medios solidificados con huevo o medios líquidos que pueden estar suplementados con agentes antimicrobianos para aumentar la selectividad de los mismos.

En cuanto a su conservación, las cepas permanecen viables por algunos meses en medios con huevo a 5°C y sobreviven indefinidamente a -70°C o por liofilización (Whitman *et al.*, 2012).

2.2 Clasificación de las micobacterias

El género *Mycobacterium*, históricamente fue difícil de separar de los taxones relacionados, en particular de los géneros *Corynebacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus*. Los primeros estudios de taxonomía micobacteriana estaban dominados por el interés clínico, lo cual promovió la tendencia de referenciar a las micobacterias en relación a *M. tuberculosis* (Whitman *et al.*, 2012). Esto fue reflejado en el uso común del término “micobacterias atípicas” para aquellas cepas que no podían ser identificadas como *M. tuberculosis* o *M. bovis*. A mediados de los años 50, Ernest Runyon y sus colaboradores clasificaron a las micobacterias atípicas, no identificadas dentro de los complejos *M. tuberculosis* o *M. leprae*, en cuatro grupos basándose en su velocidad de crecimiento y producción de pigmentos. Los Grupos de Runyon I, II y III constituían las especies de micobacterias de lento crecimiento y el Grupo IV las de rápido crecimiento. La aceptación de los Grupos de Runyon por la comunidad clínica fue un momento crucial en el desarrollo de la sistemática micobacteriana (Whitman *et al.*, 2012).

Posteriormente, Wayne (1967) introdujo una completa lista de test fenotípicos los cuales se establecieron para la clasificación de las cepas de lento crecimiento. Finalmente estudios taxonómicos coordinados y auspiciados por el IWGMT (*Working Group on Mycobacterial Taxonomy*) permitieron establecer un panel de tests reproducibles para identificar a las micobacterias de importancia clínica (Wayne *et al.*, 1980).

Muy pocas características fenotípicas apuntalan a la separación de las micobacterias de rápido crecimiento de las de lento crecimiento. Una de ellas podría radicar en la resistencia a la decoloración con ácido-alcohol después de la coloración con fucsina, la cual

tiende a ser más fuerte en las especies de lento crecimiento. En otro aspecto, la incorporación de hierro a partir de un medio rico en hierro es una propiedad más común de las especies rápidas, como el crecimiento en presencia de NaCl al 5% (P/V) o el crecimiento en presencia de ácido pícrico 0,2% (P/V) (Wayne y Kubica, 1986). Ninguna de estas características son marcadores exclusivos de la velocidad de crecimiento, pero la experiencia práctica ha demostrado que diferentes grupos de pruebas fenotípicas son necesarias para caracterizar las especies de lento y rápido crecimiento (Whitman *et al.*, 2012).

La combinación de criterios taxonómicos fenotípicos establecida por Wayne *et al.* (1980) fue muy beneficiosa, pero varias especies de crecimiento lento permanecían sin identificar. Dichas especies comenzaron a analizarse utilizando una combinación de métodos moleculares, incluyendo secuenciación del gen 16S rARN y estudios de hibridación de ADN. En general, se encontró buena concordancia total entre el grupo fenotípico resultante y los grupos de organismos definidos por procedimientos moleculares. Estas investigaciones demostraron que una taxonomía polifacética proporcionaba un camino satisfactorio para resolver relaciones entre los miembros del género *Mycobacterium* (Whitman *et al.*, 2012). La taxonomía polifacética se practica universalmente en la identificación de una nueva especie de *Mycobacterium*. Las relaciones taxonómicas de las nuevas micobacterias o las mal clasificadas pueden ser reclasificadas fácilmente por comparación de la secuencia de su gen 16S rARN con la secuencia de las correspondientes especies de micobacterias presentadas en las bases de datos. En efecto, algunas especies recientemente identificadas han sido definidas usando secuenciación de 16S rARN asociado a características fenotípicas, como por ejemplo *M. elephantis* (Shojaei *et al.*, 2000).

Pero, por otro lado, existen especies de micobacterias que tienen idéntica secuencia en su molécula de 16S rARN. En estos casos la hibridación del ADN sigue siendo el método de elección (Adékami *et al.*, 2006).

Para esclarecer relaciones entre algunas especies dentro de un complejo se han utilizado además, secuencias de otros genes menos conservados. Por ejemplo, *M. conceptionense* se describió sobre la base de los resultados del análisis de la secuenciación parcial del gen *rpoB*, permitiendo así diferenciarlo de *M. porcinum*, la especie más cercana

filogenéticamente (Adékami *et al.*, 2006). Estudios similares lograron distinguir *M. aubagnense* y *M. phocaicum* de *M. mucogenicum* (Adékami *et al.*, 2006), así como también a *M. salmoniphilum* de *M. chelonae* (Whipps *et al.*, 2007). En otros casos se han utilizado regiones intergénicas (ITS) para esclarecer la identificación de nuevas especies, como por ejemplo *M. heckeshornense* y *M. monacense* (Reischl *et al.*, 2006). En la caracterización de *M. rutilum* fue necesario un análisis filogenético de varios genes a la vez para demostrar que se trataba de una nueva especie (Hennessee *et al.*, 2009).

También la identificación taxonómica de las micobacterias se puede realizar analizando los ácidos micólicos y ácidos grasos presentes en la envoltura celular utilizando técnicas cromatográficas como HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), TLC (*Thin-Layer Chromatography*) o GC (*Gas Chromatography*). Determinando el perfil de los ácidos micólicos se pueden identificar más de 45 especies de micobacterias (Leão *et al.*, 2004).

En síntesis, para caracterizar una nueva especie aislada se aplican en conjunto tanto métodos moleculares como bioquímicos y cromatográficos. Se deben determinar una serie de características fenotípicas y bioquímicas de la colonia de micobacterias, el análisis de los ácidos micólicos y ácidos grasos por HPLC o TLC (Goodfellow y Magee, 1998), sumado al estudio molecular de los distintos genes blancos (Whitman *et al.*, 2012).

Es importante destacar que históricamente ha habido muchos intentos de clasificar a las micobacterias comenzando con la primera diferenciación entre patógenas y saprófitas, más tarde como típicas y atípicas, oportunistas, no tuberculosas u otras. Estas denominaciones si bien pueden provocar confusión debido a las diferentes interpretaciones aún siguen siendo mencionadas. Intentos posteriores han recomendado clasificarlas en tres grupos basándose en su significancia clínica (Portaels, 1995). El primer grupo comprende especies patógenas obligadas para humanos y animales: las especies que integran el complejo *M. tuberculosis*, (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. orygis* y *M. mungi sp. nov*) y las del complejo *M. leprae* (*M. leprae* y *M. lepraemurium*). Las mismas generalmente no se encuentran en el ambiente y se caracterizan por una alta virulencia aún en la forma latente durante un largo tiempo en un huésped infectado. Aunque se ha reportado la presencia de ADN de *M. leprae* en muestras de agua (Matsuoka *et al.*, 1999) y de suelo (Lavania *et al.*, 2008) en regiones endémicas lo

que indicaría un posible rol del medio ambiente en la dinámica de su transmisión. El segundo grupo comprende micobacterias potencialmente patógenas para humanos y animales, se aíslan tanto de ambientes terrestres como acuáticos pudiendo, bajo ciertas circunstancias, causar enfermedades en individuos que padecen afecciones crónicas o trastornos en el sistema inmunológico. Ejemplo de éstas son: el complejo *M. avium* (MAC) y el complejo MAIS (*M. avium-intracellulare-scrofulaceum*). Podrían considerarse como un grupo de transición entre micobacterias patógenas y saprófitas, cuyo número se incrementa debido a las existencia de severas micobacteriosis en pacientes inmunocomprometidos y los métodos cada vez más sofisticados utilizados para su diferenciación (Kazda *et al.*, 2009). El tercer grupo es el más grande y comprende especies saprófitas que no son patógenas o lo son esporádicamente, son altamente resistentes a condiciones adversas tales como la desecación y presentan además resistencia natural a los antibióticos (Vaerewijck *et al.*, 2005).

Las especies del segundo y tercer grupo son las denominadas comúnmente micobacterias no tuberculosas (MNT), micobacterias atípicas, *mycobacteria other than tuberculosis* (MOTT), o simplemente micobacterias ambientales (MA). Algunas de estas terminologías, MOTT y MNT, como ya se mencionó son confusas pues algunos miembros de estos grupos pueden causar lesiones semejantes a la tuberculosis. Cabe destacar que no presentan huésped animal primario, se encuentran en el polvo, suelo y agua, transmitiéndose por inhalación, ingestión e inoculación. No existe evidencia de transmisión directa entre individuos y las enfermedades que producen se conocen como micobacteriosis (Vaerewijck *et al.*, 2005).

2.3 Composición y arquitectura de la envoltura celular micobacteriana

El género *Mycobacterium* se caracteriza por una pared celular de estructura compleja y única, particularmente rica en lípidos, que representa alrededor del 30–60% de su peso seco (Daffe y Draper, 1998). La envoltura celular de las micobacterias ha sido considerada un factor de virulencia principal y por ese motivo ha sido ampliamente estudiada.

De acuerdo a lo descrito por Guenin-Macé *et al.* (2009), la envoltura de las micobacterias está organizada en tres compartimentos superpuestos: (i) la membrana plasmática, (ii) el esqueleto de la pared celular y (iii) la “pseudo-cápsula” (Fig. 1). Algunos

investigadores han demostrado que *M. tuberculosis* posee una capa externa con propiedades antifagocitarias muy similares a la cápsula rica en polisacáridos de otros patógenos (Stokes *et al.*, 2004).

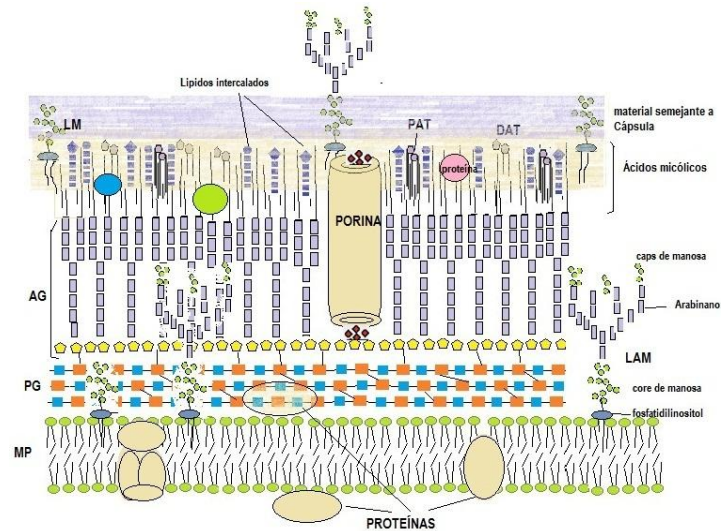


Figura 1: Pared de micobacterias. MP: membrana plasmática; PG: peptidoglicano; AG: arabinogalactano; LAM: lipoarabinomanano; LM: lipomanano; PAT: poliactilrealosa; DAT: diactilrealosa. Adaptado de Forrellad *et al.* (2013) y <http://egamor.blogspot.com.ar/2010/06/pared-celular-mycobacterium.html>.

La membrana plasmática es una bicapa asimétrica compuesta principalmente de fosfolípidos y proteínas. Los principales ácidos grasos son el ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1) y ácido tuberculoesteárico o ácido 10-metil-octodecanoico (19:0). Los fosfolípidos son derivados del ácido fosfatídico, los más comunes son el fosfatidilglicerol, difosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y el fosfatidilinositol manósido (PIM) (Daffe y Draper, 1998). Los fosfatidilinositol manósidos son propios de los actinomicetes. Éstos son la base lipídica de los lipoglicanos complejos: Lipoarabinomanano (LAM) y lipomanano (LM) (Gilleron *et al.*, 2001). Los LAM están compuestos de mananos (Man) y arabinanos (Lee y Ballou, 1965) y tanto el tamaño como el grado de ramificación del *core* de manosa son dependientes de cada especie (Guerardel *et al.*, 2002).

El esqueleto de la pared celular de las micobacterias está compuesto por un peptidoglicano unido covalentemente al arabinogalactano (AG), esterificado hacia la parte externa con ácidos micólicos. El peptidoglicano, el AG y los ácidos micólicos están presentes en todas las especies de micobacterias (Guenin-Macé *et al.*, 2009).

El peptidoglicano de las micobacterias difiere ligeramente del resto de las eubacterias ya que presenta algunos residuos químicos concretos y un número inusualmente elevado de enlaces cruzados. Este estrato está compuesto por una serie de unidades N-glicosiladas de ácido murámico y N-acetilglucosamina, no acetiladas como en otras bacterias, unidas en forma entrecruzada por cadenas del tetrapéptido L-alanil-D-isoglutamil-*meso*-diaminopimetil-D-alanina (Guenin-Macé *et al.*, 2009). El grado de reticulación del peptidoglicano de *M. tuberculosis* es de 70-80%, mientras que en *E. coli* es de 20-30% (Barrera, 2007). Se considera que el peptidoglicano es el responsable de la rigidez de la envoltura de las micobacterias y de la forma bacteriana característica (Brennan y Nikaido, 1995).

La presencia de AG es específica de las micobacterias. Este heteropolisacárido está compuesto por unidades D-arabinofuranosil y D-galactofuranosil (Daffe *et al.*, 1990). La cadena arabinano está compuesta por unidades arabinosil unidos por uniones α (1 \rightarrow 5) con ramificaciones en posición 3 y unido al núcleo de galactano. La parte galactano del AG esta unido al C-6 de algún residuo muramil del peptidoglicano a través de un puente diglicosilfosforil (Brennan y Nikaido, 1995). Aproximadamente 2/3 de las unidades de penta-arabinosa están esterificadas por ácidos micólicos (McNeil y Brennan, 1991).

La producción de ácidos micólicos es específica de los miembros del suborden *Corynebacterineae*. Los ácidos micólicos de micobacterias y corinebacterias difieren tanto en la longitud, como en las modificaciones y ramificaciones de la cadena (Barry *et al.*, 1998). Estos ácidos grasos particulares de alto peso molecular también son específicas de especie (Leão *et al.*, 2004; Whitman *et al.*, 2012) y son los responsables de la baja permeabilidad y fluidez de la envoltura celular de las micobacterias (Liu *et al.*, 1996).

Además de la composición lipídica del esqueleto de la pared celular y la capa externa que asemeja a una cápsula, la envoltura de las micobacterias contiene lípidos que están asociados con estos elementos estructurales a través de uniones hidrofóbicas. La naturaleza y composición de estos lípidos unidos no covalentemente, en la interfase entre bacterias y huésped, varía entre las especies de micobacterias. En las micobacterias de lento crecimiento se pueden dividir en dos tipos: lípidos de ftiocerol y de trehalosa. Los lípidos de trehalosa están compuestos de varios ácidos grasos que esterifican la trehalosa, la cual está formada por dos unidades de glucosa unidas por uniones α (1 \rightarrow 1). Ejemplo de ellos

son el sulfolípid 1 (SL-1), las diaciltrealosas (DAT) y poliaciltrealosas (PAT) (Daffe y Draper, 1998).

La familia de lípidos del fthiocerol comprende fthiocerol dimycocerosatos (DIM), y fenolfthiocerol dimycocerosatos o glicolípidos fenólicos (PGL), los cuales solamente están presentes en micobacterias de crecimiento lento (*M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. bovis*, *M. ulcerans*, *M. marinum*, *M. microti*, *M. kansasii*, *M. gastri*, *M. canetti*). El fthiocerol dimycocerosato desempeña un rol crítico en la permeabilidad de la pared celular, sensibilidad a los detergentes y protección contra la actividad bactericida de los macrófagos del huésped (Camacho *et al.*, 2001; Rousseau *et al.*, 2004).

También existen proteínas intercaladas en la pared micobacteriana que podrían ser exportadas o ser residentes, y algunas intervienen en la síntesis de la pared durante la vida del bacilo. Hay además ciertas proteínas llamadas porinas que forman canales hidrófilos permitiendo el paso pasivo de solutos acuosos a través de la capa de ácidos micólicos. Las porinas de las micobacterias parecen ser diferentes a las de bacterias Gram negativas (Barrera, 2007).

Al parecer cuando se cultiva a *M. tuberculosis* en medios líquidos estáticos o en el interior de una célula humana éste desarrolla una cápsula no consolidada que se separa fácilmente exponiendo una superficie lipofílica. Si bien estos componentes se reconocían en los filtrados de cultivo, su estructura y ubicación se han especificado recientemente (Barrera, 2007).

La cápsula, con función protectora y bioactiva está principalmente constituida por polisacáridos, proteínas y por pequeñas cantidades de lípidos internos que están aparentemente en rotación constante (Daffe y Etienne, 1999; Barrera, 2007). Estos constituyentes pueden ser liberados *in vivo* dentro de las células infectadas del huésped. Los principales elementos polisacáridos son el glucano, de estructura muy similar al glucógeno, arabinomananos y mananos (Lemassu y Daffe, 1994). Asimismo, las proteínas principales de la cápsula son las de 19KDa y las del complejo antígeno 85 (Belisle *et al.*, 1997).

2.4 Factores de virulencia

En los años recientes, ha habido considerables avances sobre las bases moleculares de la patogenicidad, virulencia y persistencia de las micobacterias en el huésped. Una contribución significativa ha sido la identificación de genes de virulencia esenciales

(Forrellad *et al.*, 2013). En el caso de *Mycobacterium* la mayoría de los genes de virulencia codifican enzimas que intervienen en varias rutas de síntesis de lípidos, proteínas de la superficie celular, proteínas reguladoras y proteínas de los sistemas de transducción de señales. Otro grupo de relevancia son los genes implicados en la supervivencia micobacteriana dentro del microambiente agresivo de los macrófagos del huésped. Además, muchos lípidos que forman parte de la envoltura celular y que se encuentran unidos a grupos azúcares (glicolípidos) presentan estructuras sumamente específicas e inductoras de una respuesta inmunosupresora (Borrero *et al.*, 2011).

Muchos de los genes de virulencia de las especies del complejo *M. tuberculosis* también están presentes en micobacterias no patógenas. Estos hallazgos podrían sugerir que las especies patógenas han adaptado sus genomas a partir de un estilo de vida endocelular desarrollado en condiciones ambientales, con una adquisición mínima de genes de virulencia exclusivos. Sin embargo, definir un gen como virulento dentro del genoma micobacteriano es algo complejo, sumado a la existencia de un creciente número de especies patógenas oportunistas y a la presencia de individuos altamente susceptibles (Forrellad *et al.*, 2013).

2.4.1 Componentes de la envoltura celular

Los componentes mayoritarios de la envoltura de las micobacterias son lípidos asociados a carbohidratos (glicolípidos), fosfolípidos glicosilados o carbohidratos complejos sustituidos con ácidos micólicos o péptidos. Las porciones glicosiladas de estas moléculas son importantes en la interacción con los componentes de la respuesta inmune innata y específica del huésped (Ehlers y Daffe, 1998). En las células eucariotas los glicolípidos, participan en mecanismos de comunicación celular, pero en los microorganismos se les considera factores de virulencia (Varki *et al.*, 1999).

2.4.1.1 Glicopeptidolípidos (GPLs)

Los GPLs son una clase de glicolípidos producidos por varios miembros de las MA y son constituyentes predominantes de la envoltura celular, altamente antigénicos serovar específicos (Schorey y Sweet, 2008). Se ha descrito que expresan GPLs las micobacterias de rápido crecimiento asociadas con enfermedades humanas, tales como *M. abscessus* y *M. chelonae*, (Howard y Byrd, 2000; Ripoll *et al.*, 2007), otras potencialmente patógenas de animales que incluyen *M. porcinum* y *M. senegalense* (Lopez Marin *et al.*, 1993; Howard y

Byrd 2000; Ripoll *et al.*, 2007), micobacterias de crecimiento rápido saprofíticas como *M. smegmatis*, así como también miembros del complejo *M. avium* (MAC), responsables de infecciones diseminadas en pacientes con SIDA e infecciones pulmonares en pacientes HIV negativos (Horsburgh, 1999; Field *et al.*, 2004; Wagner y Young, 2004).

En *M. smegmatis* y *M. avium* se ha observado una motilidad de deslizamiento o “*sliding*”, que se pone de manifiesto como halos de capas múltiples sobre las superficies del agar y que se asocia a la presencia de GPLs (Martinez *et al.*, 1999; Recht *et al.*, 2001). Esta motilidad de deslizamiento también parece estar relacionada con la capacidad de formación de biofilms tanto sobre superficies de PVC en sistemas de distribución de agua potable como *in vitro* (Carter *et al.*, 2003). Estas dos propiedades parecen participar en la virulencia micobacteriana, ya que su presencia en el agua potable se relaciona con la principal fuente de infección (Hilborn *et al.*, 2006) y su motilidad puede contribuir a la invasión de células epiteliales después de la ingestión o la inhalación (Yamazaki *et al.*, 2006).

Las investigaciones realizadas por Yamazaki *et al.* (2006) encontraron correlación entre la formación de biofilms y la virulencia. Todas las cepas de *M. avium* que se aislaron de pacientes con SIDA formaron biofilms sobre plástico PVC y expresaron GPLs. Además, *M. avium* fue capaz de unirse y traslocarse a través del epitelio, mientras que mutantes defectivas en la formación de biofilms y biosíntesis de GPLs disminuyeron su capacidad de traslocación, pudiendo esta característica ser relevante en la colonización bacteriana (Yamazaki *et al.*, 2006a).

Por último se ha tratado de elucidar la capacidad inmunomoduladora de los GPLs observándose que son capaces de estimular la liberación de mediadores proinflamatorios. Pero parece ser que ello depende de su estructura específica ya que ciertos GPLs son proinflamatorios mientras que otros no lo son (Barrow *et al.*, 1995; Sweet y Schorey, 2006).

2.4.1.2 Lipomananos y Lipoarabinomananos

Lipoarabinomananos (LAM), lipomananos (LM) y fosfatidil-*myo*-inositol manósidos (PIMs) se encuentran intercalados en la pared celular bacteriana. LM y LAM son los lipoglicanos mayores que están unidos no covalentemente a la membrana plasmática anclado a través de su fosfatidil-*myo*-inositol y extendido hacia el exterior de la pared celular (Besra y Brennan, 1997; Belanger e Inamine, 2000; Nigou *et al.*, 2003). Se

creo que estas moléculas complejas son importantes tanto para la fisiología de la bacteria como también para la modulación de la respuesta del huésped durante la infección. Estos lipoglicanos complejos parecen promover la supervivencia de las micobacterias, interactuando con diferentes células del huésped, regulando la producción de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, inhibiendo la actividad microbiciada de los macrófagos e impidiendo la proliferación de los linfocitos T. Las LAMs se han aislado a partir de especies de rápido y lento crecimiento, sus propiedades dependen de sus respectivas características estructurales y se constituyen por tres dominios: el fosfatidil-*myo*-inositol, una columna de polisacáridos y motivos terminales o de “*capping*” (Chatterjee y Khoo, 1998).

El LAM puede clasificarse en tres principales familias estructurales acorde al motivo de su “*cap*” terminal: LAM con terminaciones de manosa o ManLAM (presente en *M.tuberculosis*, *M.leprae*, *M. avium* y *M. kansasii*), LAM con terminaciones de fosfo-*myo*-inositol o PILAM (presente en *M. smegmatis* y *M. fortuitum*). LAM sin “*cap*” o AraLAM (presente en *M.chelonae*). Estas variantes estructurales, producidas por distintas especies de micobacterias, difieren en sus propiedades inmunomoduladoras (Guenin-Macé *et al.*, 2009). Se admite actualmente que PILAM de las especies avirulentas son pro-inflamatorios, mientras que ManLAM son anti-inflamatorios (Nigou *et al.*, 2002; Dulphy *et al.*, 2007).

Otra estrategia de supervivencia de las micobacterias patógenas asociadas al poder inmunomodulador de ManLAM es la inhibición de la apoptosis tanto de macrófagos como de células dendríticas (Mustafa *et al.*, 2001).

Finalmente, también se ha sugerido que ManLAM inhibe la fusión del fagosoma al lisosoma, lo que impediría que éste vertiera sus agentes oxidantes y diversas enzimas líticas sobre las MNT que se reproducen intracelularmente (Briken *et al.* 2004). Se ha propuesto que ManLAM directamente inhibe el incremento de la concentración citosólica del ión Ca^{+2} , y como éste sería un mediador central llevaría a la inhibición de tres importantes respuestas del macrófago a la infección: maduración del fagosoma, apoptosis y producción de γ -INF (Briken *et al.*, 2004).

2.4.1.3 Ácidos micólicos

Los ácidos micólicos representan un tercio de la masa seca de la envoltura celular y corresponden a cadenas de ácidos grasos de alto peso molecular, esterificados a los arabinogalactanos de la pared. Confieren al microorganismo una gran resistencia al daño químico y a la deshidratación, así como baja permeabilidad a diversos antibióticos lipofílicos, y protección frente a defensinas y lizosimas (Gao *et al.*, 2003). Por lo cual representan un componente importante del complejo de la pared celular micobacteriana, que proporciona la primera línea de defensa contra las condiciones ambientales potencialmente letales.

Se ha podido comprobar que la modificación de un sitio específico en estos ácidos de la pared podría ser un determinante importante en la interacción entre las micobacterias y el huésped, dado que alguna de estas modificaciones están ausentes en micobacterias no patógenas (Glickman *et al.*, 2000; Forrellad *et al.*, 2013). También se ha sugerido que estas modificaciones, por ciclopropanación de los ácidos micólicos, puede estar asociada con un aumento en la resistencia al estrés oxidativo (Yuan *et al.*, 1995).

El denominado factor cuerda o trehalosa 6,6- dimicolato (TDM) es una molécula mixta que en su estructura posee dos ácidos micólicos y se encuentra en la capa periférica de la envoltura celular. Es abundante en todas las micobacterias patógenas y recibe ese nombre debido a que las micobacterias provenientes de cultivos se observan microscópicamente formando agregados semejantes a cordones. Se considera que el factor cuerda estimula la actividad de la enzima que hidroliza al dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADasa) en el huésped, lo que trae como consecuencia la disminución en la cantidad de coenzima NAD (Vergne y Daffe, 1998). Esta coenzima es común en las reacciones catabólicas de óxido-reducción, y la ausencia de NAD interrumpe la cadena respiratoria en la mitocondria de las células (Verne y Daffe, 1998).

El factor cuerda también se ha asociado a la inhibición de la fusión de los lisosomas con los fagosomas en los macrófagos, fenómeno que se considera clave para la supervivencia de *M. tuberculosis* en estas células (Axelrod *et al.*, 2008).

2.4.1.4 2,3-Di-O-aciltrehalosa (DA)T

Este compuesto es un glicolípido localizado en la capa exterior de la envoltura celular cuya estructura está formada por dos cadenas de ácidos grasos y dos α -glucosas.

Como no se encuentra unido covalentemente al peptidoglicano, puede interactuar con las células del huésped (fagocíticas o no) e insertarse en sus membranas, alterando su funcionamiento global. Estudios realizados con *M. fortuitum* han revelado que estos residuos inducen una respuesta humoral y ejercen una acción inhibitoria en cuanto a la proliferación de linfocitos T mediada por mitógenos (Saavedra *et al.*, 2001).

Algunos otros glicolípidos suprimen la función de los linfocitos T, lo que afecta tanto a las células citotóxicas como a las CPAs; los mecanismos implicados incluyen la interferencia del proceso de presentación y la liberación de factores inhibidores tales como la PGE-2 (prostaglandina E-2) (Barrow *et al.*, 1995).

2.4.2 Micolactonas:

Una característica distintiva de la especie patógena *M. ulcerans*, agente etiológico de la enfermedad “úlceras de Buruli”, infección crónica y debilitante de la piel y tejidos blandos, es la producción de micolactona, un policétido macrocíclico con propiedades citopáticas e inmunomoduladoras (Demangel *et al.*, 2009). Otras micobacterias, relacionadas genéticamente con *M. ulcerans* (Yip *et al.*, 2007), que causan enfermedades ulcerativas en peces (*M. marinum*) y ranas (*M. liflandii*) producen moléculas similares a la micolactona (Mve-Obiang *et al.*, 2003; Trott *et al.*, 2004; Rhodes *et al.*, 2005; Ranger *et al.*, 2006, Kishi, 2011). Además estas cepas comparten un plásmido productor de variantes estructurales de micolactonas, comparable al presente en *M. ulcerans* (Yip *et al.*, 2007).

Actualmente se han identificado cinco estructuras moleculares distintas (A/B-F) que incluyen variantes producidas por aislados clínicos de *M. ulcerans* de distintos orígenes geográficos. Las variantes difieren en la estructura de la cadena lateral y muestran una actividad biológica diferente sobre las células eucariotas (Mve-Obiang *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2008). El mecanismo de secreción de micolactonas aún no está claramente descrito, pero hay evidencias que esta toxina se exporta a través de la envoltura bacteriana y se acumula en la matriz extracelular (Marsollier *et al.*, 2007).

Se ha encontrado que las micolactonas de *M. ulcerans* son capaces de suprimir la maduración de las células dendríticas e inhibir de manera selectiva la producción de citoquinas proinflamatorias (Coutanceau *et al.*, 2007). Las micolactonas también son potentes inhibidores de la producción de FNT- α por macrófagos. En particular, los niveles

de producción de FNT- α por macrófagos infectados se correlaciona con la citotoxicidad/virulencia de las cepas de *M. ulcerans* (Torrado *et al.*, 2007).

2.4.3 Fosfolipasas

La fosfolipasa C (PLC) juega un rol importante en la virulencia de varias bacterias. *M. tuberculosis* posee cuatro genes que codifican las posibles fosfolipasas C, *plcA*, *plcB*, *plcC* y *plcD* (Raynaud *et al.*, 2002). Las fosfolipasas manifiestan un amplio espectro de efectos que incluyen desde alteraciones menores en la membrana celular hasta fenómenos letales. Estas enzimas se dividen en cuatro grupos: A1, A2, C y D, dependiendo de la posición del enlace que hidrolizan en la molécula de sustrato (Raynaud *et al.*, 2002). Las actividades tanto de fosfolipasa C (PLC) como de fosfolipasa D (PLD) se han descrito en varias especies de micobacterias y han mostrado una participación en la patogenia de las micobacteriosis. Sin embargo, a pesar de que la actividad de PLD se ha detectado tanto en especies virulentas como en saprofitas, la actividad de PLC y esfingomielinasa parecen estar restringidas a especies patógenas (Johansen *et al.*, 1996). Por ejemplo, los extractos de células de *M. tuberculosis* y *M. ulcerans*, contienen tanto actividades PLD y PLC, mientras que sólo se ha reportado la actividad PLD en extractos de células de la especie apatógena *M. smegmatis* (Johansen *et al.*, 1996; Gomez *et al.*, 2000).

La PLC también se ha reportado en extractos de MA patógenas tales como *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. ulcerans* y *M. marinum*, proponiéndose que propicia la degradación de la membrana del fagosoma y la modulación de la respuesta inmune, vía la activación de la cascada del ácido araquidónico. Su expresión aumenta en macrófagos infectados, lo que sugiere algún papel relevante en la patogénesis (Raynaud *et al.*, 2002; Stamm y Brown, 2004).

2.4.4 Inhibición de la formación del fagolisosoma

La infección por micobacterias patógenas depende de la entrada y multiplicación en fagocitos mononucleares. Se ha establecido que una variedad de especies virulentas tales como *M. tuberculosis*, *M. marinum*, *M. avium* y *M. bovis* BCG, residen en un compartimento fagosomal privilegiado (Guenin-Macé *et al.*, 2009). En los fagosomas de macrófagos que contienen micobacterias falla la fusión con los lisosomas y la maduración para convertirse en fagolisosoma (Vergne *et al.*, 2004). Los fagosomas micobacterianos

exhiben acidificación limitada, ausencia de hidrolasas lisosomales (Malik *et al.*, 2000; Malik *et al.*, 2001) y muestran aberraciones en el tráfico de marcadores de membrana.

A pesar de no poderse fusionar con los lisosomas, los fagosomas micobacterianos permanecen dinámicos, según lo sugerido por el acceso de las micobacterias al hierro unido a transferrina de la vía de reciclaje endosomal y al tráfico de receptores de transferrina (Clemens y Horwitz, 1996; Russell *et al.*, 1996).

El ManLAM de *M. tuberculosis* inhibe la maduración del fagosoma (Fratti *et al.*, 2003). Los lipoarabinomananos son liberados en los fagosomas que contienen micobacterias y se intercalan en varias endomembranas de los macrófagos infectados. Esta inserción es un prerrequisito para el arresto fagosomal (Welin *et al.*, 2008).

Otros lípidos micobacterianos, como el glicolípido 6,6'-dimicolato de trealosa (TDM), intervienen en la inhibición de la maduración del fagosoma. Es interesante que la función virulenta del TDM sea superada por la inducción de la enzima óxido nítrico sintetasa mediada por el γ -IFN en la célula huésped (Axelrod *et al.*, 2008).

Sumado a la inhibición de la maduración fagosómica, las micobacterias vivas de las especies *M. tuberculosis*, *M. marinum* y *M. leprae*, pueden escapar al citosol, siendo un requisito para ello dicha inhibición (Castaño y Rojas, 2010).

También han descrito una serina/treonina quinasa, PknG, de micobacterias patógenas que podrían modificar las proteínas del huésped implicadas en el control de las vías del tráfico intracelular a partir de los fagosomas que contienen micobacterias vivas (Vergne *et al.*, 2005). Esto demuestra que el arresto fagosomal parece ser un fenómeno complejo donde se involucran múltiples genes micobacterianos (Pethe *et al.*, 2004).

2.4.5 Escape del fagosoma

Se ha demostrado que algunas cepas de *M. marinum*, son capaces de inducir la polimerización de actina activamente dentro de los macrófagos. Estos hallazgos demuestran que *M. marinum* puede escapar del fagosoma al citoplasma de los macrófagos infectados, en los que puede reclutar factores citoesqueléticos de la célula huésped para inducir la polimerización de actina que lleva a la propagación de célula a célula. Este mecanismo ya se ha descrito en otros microorganismos de vida endocelular que incluyen *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* y *Rickettsia rickettsii* (Goldberg, 2001). La propagación directa entre célula y célula permite a estos patógenos eludir de cierta manera al sistema

inmune del huésped, por ejemplo a la acción del complemento y a los anticuerpos (Stamm *et al.*, 2003).

Van der Wel *et al.* (2007) han observado que los lisosomas rápidamente se fusionan con los fagosomas que contienen cepas virulentas de *M. tuberculosis* y *M. leprae* en macrófagos y células dendríticas derivadas de monocitos humanos y después escapan del fagolisosoma al citosol en células no apoptóticas. Esta entrada al citosol no fue observada en el caso de *M. bovis* BCG y se describió que es dependiente de los productos génicos micobacterianos CFP-10 (10-kDa *Culture Filtrate Protein*) y ESAT-6 (6-kDa *Early Secretory Antigenic Target*), implicados en la motilidad ya expuesta para *M. marinum* (Gao *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2004).

Recientes evidencias muestran que las micobacterias han desarrollado un sistema de secreción especializado para el transporte de proteínas a través de la pared celular altamente impermeable e hidrofóbica denominado sistema de secreción tipo VII (T7SS) (Forrellad *et al.*, 2013). *M. marinum* posee un T7SS muy similar al de *M. tuberculosis*, y se ha demostrado su localización polar en el bacilo por microscopía electrónica y confocal (Carlsson *et al.*, 2009). Similares resultados han sido obtenidos en *M. smegmatis* (Wirth *et al.*, 2012). ESAT6 y CFP10 son dos proteínas importantes secretadas por el T7SS, localizadas en el locus de virulencia llamado RD1 (Region of Difference 1), que además de estar presente en *M. tuberculosis*, también se encuentra en *M. bovis*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. africanum*, *M. leprae* (Berthet *et al.*, 1998; Harboe *et al.*, 1996), *M. zulgai* y *M. riyadhense* (van Ingen *et al.*, 2009) y ausente en *M. bovis* BCG y *M. microti* (Berthet *et al.*, 1998; Harboe *et al.*, 1996).

2.5 Micobacteriosis

La Organización Mundial de la Salud define a la micobacteriosis, como la infección bacteriana producida por micobacterias no tuberculosas o micobacterias ambientales (WHO, 2004).

Entre las características más importantes que distinguen a las MA y que las diferencian de las patógenas obligadas, son la baja virulencia y la falta de transmisión de persona a persona. Sin embargo, no se debe subestimar su patogenicidad especialmente en el huésped inmunocomprometido. Son patógenos oportunistas, su fuente de infección es el

medio ambiente y la transmisión se produce por ingestión o inhalación de agua, partículas, aerosoles o por un trauma (Falkinham, 2003).

La presentación histórica de las enfermedades por MA ha ido cambiando, tanto en personas mayores como en niños con enfermedades predisponentes (Falkinham, 2003).

Las infecciones diseminadas producidas por MNT fueron reconocidas por primera vez en pacientes inmunocomprometidos, posteriormente identificadas como una complicación común de pacientes con SIDA avanzado y como una de las principales causas de muerte entre la población con HIV. Desde los años 80 estudios clínicos y de laboratorio mostraron un incremento en la prevalencia de personas con enfermedades pulmonares por MNT mientras que durante el mismo periodo se reportó un continuo declive en la incidencia y prevalencia de la tuberculosis (WHO, 2004).

Al tratarse de enfermedades que no requieren una declaración obligatoria no se disponen de datos precisos, aunque se ha observado una reducción de las micobacteriosis en pacientes infectados por HIV, respecto a las nuevas manifestaciones en individuos con inmunosupresión iatrogénica subyacente (Tortoli, 2006; Browne *et al.*, 2012).

Es necesario destacar que, conjuntamente con el aumento de la frecuencia de aislamientos de MNT, se van describiendo nuevas especies susceptibles de producir patología en humanos. Más de un tercio de la totalidad de especies descritas de micobacterias pueden ser patógenas oportunistas. Se han aislado de pacientes que sufren diferentes afecciones y la mayoría se han recuperado de variados hábitats ambientales (Kazda, 1983; Covert *et al.*, 1999; Oriani y Sagardoy, 2002; Falkinham, 2009), como así también se han caracterizado los distintos factores de riesgo (Falkinham, 2009).

El pulmón es el órgano más frecuente infectado por MA y las manifestaciones clínicas se asemejan a las observadas en los casos de tuberculosis. Se han descripto como agentes etiológicos de infecciones pulmonares más frecuentes a las cepas del complejo MAC y *M. kansasii* (Falkiman *et al.*, 2001; Katoch, 2004).

Las micobacterias patógenas oportunistas también se han identificado como agentes etiológicos de infecciones extrapulmonares, implicando a glándulas linfoides, piel, huesos, tejidos blandos o heridas. Sus patologías presentan diversas sintomatologías y se pueden manifestar tanto localizadas como diseminadas, dependiendo de la predisposición y de las condiciones del sistema inmunológico del paciente. Se pueden considerar de acuerdo a las

evidencias descritas que existe una notable variabilidad geográfica en cuanto a la prevalencia de las especies responsables (Theodorou *et al.*, 2001; Katoch, 2004).

En el caso de niños con linfadenitis cervical, los datos recopilados han expuesto que la especie micobacteriana predominante aislada a partir de nódulos linfáticos era *M. scrofulaceum* hasta 1980 aproximadamente, cuando *M. avium* comenzó a ser la especie más frecuente (Wolinsky, 1995).

Sumado a ello, en los últimos años se han reportado infecciones por MA como resultado de procedimientos quirúrgicos o estéticos (mesoterapia, cirujías, tatuajes, fotorrejuvenecimiento, entre otros) sin una aparente causa predisponente (Cooksey *et al.*, 2004, García-Navarro *et al.*, 2008; Herreros *et al.*, 2009; García *et al.*, 2010, Culton *et al.*, 2013), así como en aquellos individuos con hábitos de alcoholismo y el tabaco (Falkinham, 2009).

Si bien la totalidad de las MA patógenas pueden causar infecciones cutáneas y de tejidos blandos, las más frecuentes son *M. marinum*, *M. ulcerans* y las de crecimiento rápido *M. fortuitum*, *M. chelonae* y *M. abscessus* (Alcaide y Esteban, 2010). Las micobacteriosis cutáneas suelen producirse por la exposición de heridas traumáticas o quirúrgicas al agua, por productos contaminados con MNT, o bien por enfermedad diseminada, especialmente en los pacientes inmunodeprimidos (Alcaide y Esteban, 2010).

La mayoría de las micobacteriosis cutáneas están causadas por especies de distribución mundial. Sin embargo, otras tienen una delimitación geográfica, como *M. ulcerans*, que produce una infección cutánea endémica, sobre todo en África central y occidental (úlceras de Buruli) y Australia (úlceras de Bairnsdale), donde se considera la tercera enfermedad micobacteriana más frecuente después de la tuberculosis y la lepra. La úlcera de Buruli es una enfermedad necrotizante progresiva de la piel que afecta principalmente a niños, produciendo úlceras masivas que si no se tratan pueden causar desfiguraciones permanentes e incapacidad (Kishi, 2011).

Es de destacar que algunas investigaciones indican que ciertos insectos acuáticos y mosquitos podrían albergar *M. ulcerans* en sus glándulas salivares y transmitir la enfermedad (Marsollier *et al.*, 2002; Kishi, 2011).

El patrón cambiante de la enfermedad por MNT y el aumento de la prevalencia podría asociarse a la capacidad de estos patógenos para sobrevivir y proliferar en ambientes

que comparten con los seres humanos, tales como los sistemas de distribución del agua potable, sumado a la longevidad de la población y un aumento en la proporción de individuos inmunosuprimidos, con el agravante de la resistencia natural que presentan a los antibióticos de amplio espectro (Falkinham, 2003).

Aunque las MNT causan una gran variedad de enfermedades humanas, los datos sobre la incidencia de dichas infecciones todavía no existen, debido principalmente a la ausencia de estudios epidemiológicos sistemáticos, falta de definiciones estándar de casos y la no identificación exacta de las micobacterias. Por otra parte, las manifestaciones clínicas inespecíficas, la falta de familiaridad con estas infecciones y los servicios de laboratorio inadecuados hacen que el diagnóstico definitivo de la enfermedad por MA a menudo se retrase o incluso sea imposible. La correlación de las pruebas de sensibilidad *in vitro* con el resultado clínico, la composición y la duración de los regímenes de tratamiento y el uso de la cirugía u otros enfoques terapéuticos aún no están definidos para la mayoría de especies de MA implicadas en enfermedades humanas. Se necesitan investigaciones y ensayos controlados coordinados por laboratorios multicéntricos para mejorar el diagnóstico de las micobacteriosis (Piersimoni y Scarparo, 2009).

2.6 Hábitat de las micobacterias ambientales

A fin de determinar el hábitat de las MA se han realizado numerosos estudios. Estos microorganismos se pueden encontrar en aguas naturales, en sistemas de distribución de agua de red, tanto de hogares como de hospitales, piscinas, acuarios, agua de lluvia, nieve, suelos, polvo y aerosoles. Es propicio establecer qué tipo de ambiente contribuye a su proliferación y cuáles simplemente actúan como vector de las micobacterias (Kazda *et al.*, 2009). En el polvo o aire no pueden multiplicarse por lo cual sólo se consideran contaminantes. En cambio sí pueden replicarse en agua de río, agua estancada o fango, formando parte de la microbiota o bien por contaminación con aves o polvo. La multiplicación es seguida de una fase estacionaria donde algunas bacterias se asientan y sobreviven en el barro (Kazda, 1983). En el suelo seco no tendría lugar la multiplicación de las micobacterias debido a la falta de humedad, aunque en nuestro laboratorio se ha aislado *M. kansasii* de suelos arenosos del oeste pampeano (Oriani y Sagardoy, 2002) y otras micobacterias en los suelos de la provincia de Chaco (datos aún no publicados). En suelos húmedos o inundados las micobacterias pueden crecer cuando las condiciones de humedad

y temperatura son adecuadas. En cuanto a las aguas de río podemos decir que las micobacterias se hallan en tránsito ya que su hábitat sería la capa gris de musgo de la cual se desprenderían (Kazda, 1983).

Los diferentes nichos ecológicos que podrían albergar micobacterias se caracterizan porque los factores bióticos y abióticos están en continuo cambio, por lo tanto el hallazgo de las micobacterias es variable. En los cuerpos de aguas naturales, la proliferación de micobacterias se ve favorecida por el contenido de materia orgánica como los ácidos húmicos, bajos valores de pH y bajo contenido de oxígeno disuelto. Estas condiciones ejercen una presión de selección favoreciendo a las micobacterias respecto de otros microorganismos de rápido crecimiento (Kirschner *et al.*, 1999; Vaerewijck *et al.*, 2005). La hidrofobicidad que presentan le permite colonizar la interfase aire-agua y posteriormente desprenderse y propagarse por aerosoles, siendo ésta la principal forma de propagación (Vaerewijck *et al.*, 2005).

Uno de los factores importantes a tener en cuenta es la temperatura de los ambientes acuáticos ya que regula la multiplicación de las mismas. Temperaturas entre 17° y 22, 5 °C favorecen la multiplicación de distintas especies de micobacterias, mientras que a 15 °C se detiene el crecimiento, observándose una gradual reducción entre 9° y 4 °C (George *et al.*, 1980). Es de destacar que *M. ulcerans* se reproduce entre 29° y 32 °C, mientras que *M. xenopi* puede hacerlo a 42°C. Además se ha descrito que *M. avium*, *M. scrofulaceum*, *M. kansasii* y *M. xenopi* se han recuperado de sistemas de distribución de agua caliente que oscilaban entre 52 y 57 °C. En cuanto a *M. avium* subespecie *paratuberculosis* se ha comprobado que es capaz de soportar tratamientos térmicos aplicados a la leche para consumo humano, sobrevive a 71,7°C por 15 segundos (Grant *et al.*, 2002)

Otro factor determinante en el desarrollo bacteriano es el pH. Es reconocido que las micobacterias saprófitas pueden desarrollarse en un amplio rango de pH entre 3 y 10, a medida que las bacterias son patógenas oportunistas u obligadas disminuye el rango de pH en el que pueden desarrollarse. Por ejemplo *M. smegmatis* puede crecer entre pH 3,5 a 9,5, *M. avium* en un intervalo de 4 a 7,5, *M. kansasii* entre 5 a 7,5 y *M. tuberculosis* entre 6 y 6,5 (Kazda, 1983).

Por otra parte, es importante destacar que algunas micobacterias ambientales son capaces de crecer dentro de las amebas de vida libre (Miltner y Bermudez, 2000) y de

ciliados (Thomas y McDonnell, 2007). Se ha sugerido que esta propiedad puede proporcionar un refugio útil en el medio ambiente cuando las condiciones se deterioran. Si bien la transmisión ambiental dentro de amebas es una posibilidad, no queda claro si las amebas, o cualquier otro protozoo, juegan un papel en la patogénesis o la epidemiología de las enfermedades micobacterianas (Briansesco *et al.*, 2010).

Debido a su tamaño, las amebas son más propensas a colonizar los sistemas de distribución de agua potable filtrada o sistemas en los que se ha producido un fallo en el tratamiento del agua. Algunos estudios sugieren que la filtración puede reducir las MNT en los sistemas de distribución mediante la eliminación de micobacterias asociado con las partículas que contribuyen a la turbidez en el agua de origen (Falkinham *et al.*, 2001).

Interesantemente, se ha observado que el crecimiento intracelular de *M. avium* tanto en macrófagos como en amebas de vida libre resulta en un aumento de la virulencia (Cirillo *et al.*, 1997) y la resistencia a los antibióticos (Miltner y Bermúdez, 2000).

Las micobacterias pueden constituirse como parte natural del ecosistema o probablemente las actividades humanas influyen en su distribución y prevalencia en el medio ambiente. Un claro ejemplo es el tratamiento de los suministros de agua potable con cloro u otros desinfectantes que puede conducir a la selección de MA (Norton y LeChevallier, 2000). En efecto, se ha demostrado que estos microorganismos son resistentes al ozono y a desinfectantes a base de cloro (Taylor *et al.*, 2000). Las micobacterias pueden resistir concentraciones de cloro libre de $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ durante 60 min. Más del 80 % de los cultivos de *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. gordonae* y *M. scrofulaceum* sobreviven 10 min de exposición a $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cloro libre (Dailloux *et al.*, 1999; Falkinham *et al.*, 2001).

El número de micobacterias parece ser más elevado en los sistemas de distribución de agua que en la muestra colectada inmediatamente después del tratamiento, sugiriendo que son capaces de multiplicarse a lo largo del sistema de distribución (Norton *et al.*, 2004). Esto puede explicarse porque las micobacterias son capaces de formar biofilms y persistir en un sistema de fluidos a pesar de su lento crecimiento. La elevada hidrofobicidad de la pared celular de las micobacterias favorece la adhesión, la resistencia a desinfectantes y a metales pesados, como así también la capacidad para formar biofilms en un variedad de superficies orgánicas (plásticos, PVC, caucho, silicona, celulosa) e inorgánicas (cobre,

vidrio) (Leão *et al.*, 2004). Debemos considerar además, la capacidad que presentan para crecer a bajas concentraciones de carbono, lo que las hace importantes competidores en condiciones de oligotrofia como lo son los sistemas de abastecimiento de agua de red (Norton *et al.*, 2004).

Numerosos investigadores han tratado de elucidar las causas que llevan a que el agua tratada, luego de su entrada al sistema de distribución, llegue al consumidor con una calidad disminuida y la posibilidad de estar contaminada con patógenos oportunistas, en este caso con MA (Liu *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013). Para entender el microambiente generado en el sistema de distribución de agua de red se puede observar la Figura 2. El agua es considerado un vehículo de partículas, microorganismos y nutrientes a través del sistema de distribución. A su paso se va formando un biofilms en las paredes inertes de la tubería, mientras que algunas partículas son transportadas como coloides o sólidos en suspensión y pueden acumularse en el fondo, formando un depósito suelto. Las condiciones hidrodinámicas son de gran importancia para el comportamiento de las bacterias en las biopelículas ya que afectan a su acumulación y desprendimiento (Manuel *et al.*, 2007).

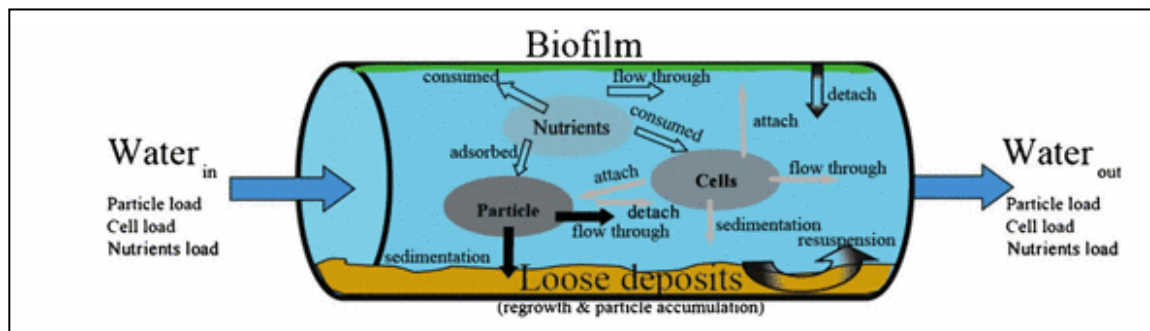


Figura 2: Procesos relacionados al crecimiento microbiano en los sistemas de distribución de agua de red. (Liu *et al.*, 2013)

El complejo *M. avium* (MAC) y micobacterias de rápido crecimiento tales como *M. abscessus*, *M. mucogenicum*, *M. chelonae*, y *M. fortuitum*, son a menudo recuperados de suplementos de agua potable como parte de la microbiota (Williams *et al.*, 2009). Algunas especies pueden colonizar los sistemas de distribución de agua fría (por ejemplo, *M. kansasii*) mientras que *M. xenopi* y *M. avium* son más comúnmente asociados con sistemas de agua caliente (Briancesco *et al.*, 2010).

Le Dantec *et al.* (2002) investigaron la eficacia de la cloración para varias especies aisladas a partir de los sistemas de distribución de agua, relacionados a dos plantas de tratamiento. Identificaron una amplia gama de especies que incluyeron *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. aurum*, *M. peregrinum* y *M. gordonae*, no recuperándose *M. avium*. La eficiencia de la cloración se estimó para varias especies, encontrando que *M. chelonae* y *M. fortuitum* fueron altamente resistentes al cloro, en las concentraciones que se utilizan normalmente, seguidos de *M. gordonae* y *M. aurum*. Incluso las especies más susceptibles como *M. aurum* y *M. gordonae*, resultaron 100 y 330 veces más resistentes al cloro que *E. coli*.

Estos investigadores utilizaron a *M. gordonae* como un modelo para probar los diferentes parámetros que pudiesen afectar la cloración, tales como pH, temperatura y disponibilidad de nutrientes. Sus resultados mostraron que *M. gordonae* es más resistente al cloro en medios con bajos nutrientes, mientras que mejoraba la inactivación con los mismos niveles de cloro cuando se aumentaba la temperatura (de 4°C a 25°C) y se disminuía el pH.

M. marinum, a menudo es recuperado de piscinas de natación o acuarios y pueden causar infección de piel erosionada, principalmente en aquellas personas con hobbies u ocupaciones relacionadas a la pesca y a la natación (Salik y Del Marmol, 2011).

También, en el ámbito hospitalario, es frecuente recuperar micobacterias tanto de abscesos como de infecciones debidas a prácticas vinculadas a diálisis, endoscopías y/o a catéteres favoreciendo estos materiales la formación de biofilms y como consecuencia mayor resistencia a los desinfectantes (Leão *et al.*, 2004; Schelonka *et al.*, 1994). Se ha demostrado que este incremento no resulta de la dificultad de los agentes antimicrobianos de penetrar entre las capas de células y la matriz extracelular del biofilm, ya que esta capacidad se manifiesta en bacterias separadas, lavadas y expuestas en suspensión nuevamente al agente microbiano (Steed y Falkinham 2006; Falkinham *et al.*, 2008). El incremento en la resistencia es adaptativo, no genético, pues se pierde dicha resistencia luego de un día de crecimiento en suspensión de las células recuperadas a partir del biofilm (Steed y Falkinham, 2006). Estas observaciones apuntan al hecho que, aunque las MNT son de crecimiento lento, su metabolismo es tan rápido como el de cualquier otra bacteria y son capaces de una rápida adaptación para mejorar su supervivencia (Falkinham, 2009).

La investigación de la transmisión de micobacterias por el agua puede ser difícil, ya que las infecciones suelen ser esporádicas y hay una variedad de otras fuentes de exposición. Se suma que los esquemas de tipificación que se usan de rutina no discriminan suficientemente para identificar con seguridad que los aislamientos ambientales son los mismos que se asocian al paciente (Briancesco *et al.*, 2010).

Senna *et al.* (2008) evaluó la viabilidad del uso de la secuenciación del gen *hsp65* para identificar micobacterias y analizar su variabilidad genética. En este estudio, presentó un análisis filogenético de cepas aisladas en el laboratorio clínico y cepas aisladas del medio ambiente. Las variaciones genéticas de las secuencias del gen *hsp65* entre aislamientos clínicos y ambientales fueron similares, lo que sugiere una creciente relación entre algunas especies del entorno y las que infectan a humanos. La infección casi puede estar exclusivamente asociada con micobacterias ambientales que se han adaptado a los seres humanos y puede estar facilitada principalmente en hospitales, donde los pacientes con inmunidad reducida están más expuestos (Senna *et al.*, 2008). Se han reconocido por muchos años infecciones por micobacterias asociadas a sistemas de agua de red de hospitales (Wallace *et al.*, 1998), particularmente a sistemas de agua caliente (Du Moulin *et al.*, 1988).

Otros investigadores aislaron *M. avium* tanto de muestras clínicas como de fuentes de agua potable y compararon dichos aislamientos entre sí utilizando métodos moleculares (Hilborn *et al.*, 2008). Algunas cepas aisladas a partir de pacientes se relacionaron con los aislamientos de agua. Además se identificaron grupos de aislamientos clínicos indistinguibles entre sí sugiriendo una fuente común de exposición.

M. avium también fue aislado de muestras de agua de red y de biofilm recogidos de la ducha del hogar de una mujer con enfermedad pulmonar por *M. avium*. Estudios de las secuencias de inserción IS1245/IS1311 demostraron que *M. avium* recuperados de agua caliente, fría y de biofilms presentaron una relación clonal con *M. avium* aislado del paciente. Estos datos demostraron que las duchas pueden servir como fuentes de infección para *M. avium* (Falkiman *et al.*, 2008).

La variabilidad genética dentro de las especies de MNT se manifiesta en la diferente capacidad de virulencia, la diferenciación en la morfología de la colonia, la apariencia de los distintos tipos geográficos y la variación clonal existente ya sea si se recupera del medio

ambiente o se aísla de un paciente (Falkinham, 2009). El aspecto más preocupante de esta variación genética en las MNT es la amplia diferencia en la virulencia de las cepas de una misma especie (McGarvey y Bermúdez, 2002).

2.7 Métodos fenotípicos y moleculares para la identificación de MA

2.7.1 Métodos fenotípicos

La visualización de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) en extendidos coloreados mediante las técnicas de Ziehl-Neelsen o auramina es la primera evidencia de la presencia de micobacterias en una muestra y asociada a los datos clínicos del paciente, ayuda a establecer el diagnóstico presuntivo de una micobacteriosis (García-Martos y García-Agudo, 2012). El cultivo de la misma en medios apropiados y la identificación de las especies aisladas mediante técnicas fenotípicas, bioquímicas, cromatográficas y moleculares contribuyen al diagnóstico de certeza (Leão *et al*, 2004; García-Martos y García-Agudo, 2012).

La identificación de especies del género *Mycobacterium* a través del uso de pruebas bioquímicas convencionales, es el método más antiguo y utilizado por el Laboratorio de Diagnóstico Clínico. Tradicionalmente, la taxonomía basada en características bioquímicas para la identificación de micobacterias fue limitada, en términos de su capacidad para diferenciar especies tales como *M. avium* y *M. intracellulare* (Wayne y Kubica, 1986; Goodfellow y Magee, 1998). El enfoque taxonómico basado en el cultivo es laborioso, complejo, se requiere de tiempo considerable y a veces es condicionado por el lento crecimiento de algunas especies de *Mycobacterium*.

Por otra parte, los esquemas de identificación bioquímicas estándares pueden conducir a resultados ambiguos, ya que algunas de las pruebas que se utilizan no pueden ser totalmente reproducibles, el fenotipo de una especie no es una propiedad absoluta y la base de datos de características fenotípicas se limita a las especies más comunes. Cuando se evidencia la variabilidad de los resultados en la identificación fenotípica que no concuerdan con los establecidos para una determinada especie, es imposible discernir por este método si en realidad se trata de una nueva especie o simplemente son variables fenotípicas de la misma (Springer *et al.*, 1996)

La necesidad de identificar en la actualidad un mayor número de especies y la importancia de un diagnóstico precoz han motivado el desarrollo de nuevas técnicas más

sensibles y específicas. En los últimos años, se han diseñado métodos alternativos rápidos para la identificación de micobacterias en la clínica médica, tales como hibridación con sondas de ADN, análisis de ácidos micólicos y ácidos grasos de la pared celular por HPLC y TLC, secuenciación del ADN, *microarrays* y otros ensayos basados en PCR. Actualmente para la identificación de especies de micobacterias se emplean en muchos laboratorios del mundo, métodos mejorados de cultivo como el sistema BACTEC MGIT 960 (*Mycobacteria Growth Indicator Tube*) (Tortoli *et al.*, 1999; Siddiqi *et al.*, 2006), complementado con sondas de ADN. La utilización del análisis de ácidos micólicos y secuenciación de ADN requieren conocimientos técnicos y equipos especiales (Leão *et al.*, 2004) de alto costo para ser contemplados por los sistemas de salud de muchos países en desarrollo.

2.7.2 Métodos moleculares

2.7.2.1 Hibridación con sondas de ADN

Un sistema de fabricación comercial, el método de hibridación con sondas de ADN denominado AccuProbe® System (Gen Probe, Inc. SanDiego, California), está disponible para la identificación de varias especies de micobacterias a partir de un cultivo. El mismo se basa en el uso de sondas de ADN especie específicas de simple cadena con un marcador quimioluminiscente, que son complementarias al ARN ribosómico del organismo blanco. La sonda de ADN marcada se hibrida con el rARN del microorganismo para formar un híbrido ADN-ARN estable. Un reactivo de selección elimina la señal en todo el ADN no unido. La quimioluminiscencia producida por los híbridos ADN-ARN se mide en un luminómetro. Existen sondas disponibles para la identificación del complejo *M tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. gordonae*, complejo *M. avium-M. intracellulare* y *M. kansasii*. (Richter *et al.*, 1999; Leão *et al.*, 2004). Su inconveniente principal es su elevado costo (Soini *et al.*, 2001).

2.7.2.2 Hibridación reversa

El método INNO-LiPA Micobacterias v 2 (Innogenetics NV, Gante, Bélgica) consiste en amplificar por PCR la región 16S-23S rARN (ITS-1) utilizando *primers* biotinilados. El amplicón obtenido de 400-550 pb marcado con biotina, se hibrida con sondas de oligonucleótidos específicos que se encuentran inmovilizadas en una tira de membrana de nylon formando líneas paralelas entre sí. Posteriormente se adiciona el

conjugado streptavidina-fosfatasa alcalina que se une a los híbridos biotinilados previamente formados (Figura 3). Finalmente, los híbridos son detectados a través de una reacción colorimétrica. Mediante este método se puede detectar al género *Mycobacterium* y las siguientes especies: complejo *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. gordonae*, *M. genavense*, *M. simiae*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. celatum*, complejo MAIS (*M. avium*, *M. intracelulare*, *M. scrofulaceum*), *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. haemophilum*, complejo *M. chelonae*, complejo *M. fortuitum* y *M. smegmatis* (Suffys *et al.*, 2001; Leão *et al.*, 2004).

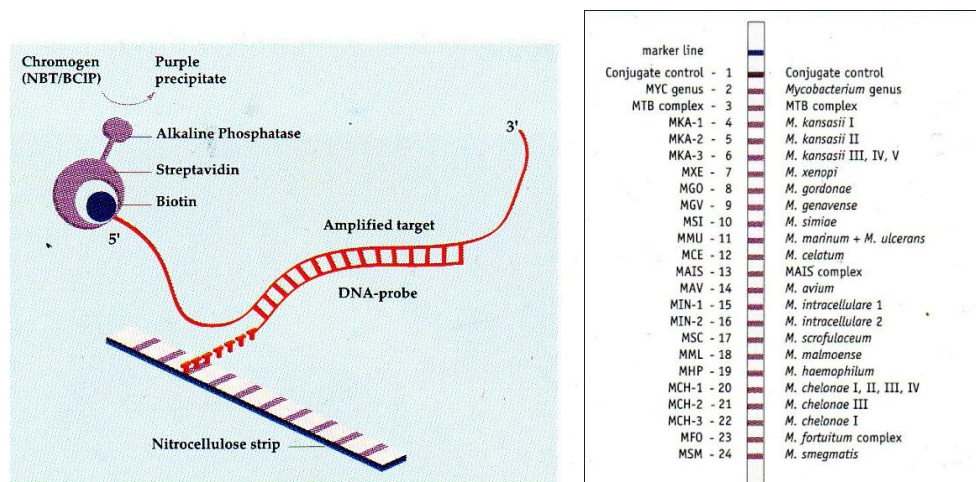


Figura 3: Principio de la hibridación inversa para la detección de especies de *Mycobacterium* (INNO-LiPA *Micobacteria* v2).

Los métodos que utilizan sondas de ADN marcados si bien son muy específicos se centran en un limitado número de especies de micobacterias de importancia clínica (Dvorská *et al.*, 2001; Soini *et al.*, 2001).

2.7.2.3 Secuenciación de un fragmento del gen 16S rARN

El método molecular de referencia para la identificación de micobacterias es la secuenciación de un fragmento del gen ARN ribosomal 16S (16S rARN). La molécula de 16S rARN es altamente conservada, con cambios de secuencia de significancia filogenética, las cuales son específicas a nivel de especie (Leão *et al.*, 2004). Esta región se caracteriza por tener un polimorfismo alto entre diferentes especies pero bajo dentro de una misma especie. Rogall *et al.* (1990) describieron un método para determinar la secuencia

del 16S rARN por secuenciación directa de un fragmento de ADN de 1kb que contiene el extremo 5' del gen. Se han identificado dos regiones hipervariables, región A (posiciones 123 a 273) y la región B (posiciones 430 a 500). Si bien la mayoría de las especies muestran una única secuencia en la región hipervariable A, se ha observado que *M. gordonae* muestra variabilidad intraespecífica en dicho gen (Leão *et al.*, 2004).

De acuerdo a Kirschner y Böttger (1998) para la identificación de las micobacterias se utilizan los *primers* 264 (correspondiente a la posición 1046 a 1027 de *E coli*), y 285 (correspondiente a la posición 9 a 30 de *E coli*). Debido a la especificidad del primer 264, preferentemente se amplifica el fragmento de 16S rARN micobacteriano, permitiendo la correcta identificación de las micobacterias aún en cultivos contaminados.

Una desventaja de este método es que especies estrechamente relacionadas, como *M. kansasii* y *M. gastri*, tienen idéntica secuencia de dicho gen (Kirschner y Böttger, 1998). Un método útil para diferenciar entre estas dos especies es la secuenciación de la región espaciadora entre los genes 16S-23S rARN (ITS-1) o el método PRA (PCR-Restriction Enzyme Analysis) descrito por Telenti *et al.* (1993). *M. ulcerans* y *M. marinum* tienen prácticamente secuencias homólogas del gen 16S rARN y por lo tanto no pueden distinguirse por el análisis de las secuencias de las regiones A y B. Lo mismo ocurre con *M. chelonae* y *M. abscessus*. Existe una base de datos de acceso público en <http://www.ridom.de> que contiene las secuencias del extremo 5' del gen 16S rARN de micobacterias (desde la posición 54 a la 510) obtenido a partir de aislamientos de cultivo de colección. Si bien la disponibilidad de la técnica se limita a pocos laboratorios, la información que genera permite además evaluar la confiabilidad de los otros métodos de tipificación utilizados (Kirschner y Böttger, 1998).

2.7.2.4 Secuenciación del gen *hsp65*

La familia de la proteína de 60 kDa del choque térmico (*hsp60* o *hsp65*), se han considerado como marcadores filogenéticos útiles en varios géneros de eubacterias (Viale *et al.*, 1994; Kwok *et al.*, 1999; Ringuet *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005), debido a su ubicuidad y estructuras primarias muy conservadas. También es reconocido que casi todas las especies bacterianas tienen una única copia de los genes *hsp60* o *hsp65* en su genoma, que significa que este gen no es fácil de transferir de una bacteria a otra y siendo

entonces adecuado para estudios filogenéticos de especies o cepas estrechamente relacionadas (Kwok *et al.*, 1999).

La secuenciación parcial de un fragmento de 441 pb del gen *hsp65* se ha utilizado con éxito para la identificación de especies del género *Mycobacterium*, aisladas a partir de muestras clínicas (Ringet *et al.*, 1999).

2.7.2.5 PRA (PCR-Restriction Enzyme Analysis)

La identificación adecuada de las MNT puede realizarse por medio de la técnica de PRA (PCR-Restriction Enzyme Analysis) (Telenti *et al.*, 1993; Devallois *et al.*, 1997). El análisis de los patrones de restricción constituye un método simple, rápido y más económico con respecto a otros que utilizan sondas comerciales, siendo posible de ser implementado en forma rutinaria en los laboratorios de referencia de micobacterias. Este método molecular se basa en la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de un fragmento polimórfico de 441 pb del gen *hsp65* que codifica para la proteína del shock térmico de 65kDa. El producto amplificado es digerido con las enzimas de restricción *BstEII* y *HaeIII* y la interpretación de los patrones de restricción se realiza por la simple observación de dichos patrones (Telenti *et al.*, 1993) y por algoritmos disponibles en la página de Internet (<http://app.chuv.ch/prasite>). Así, es también posible diferenciar *M. tuberculosis* del resto de las micobacterias que integran el género. Además con esta técnica han sido observadas algunas variantes de patrones dentro de una misma especie como en *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare*, *M. flavescens*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. terrae* y en el complejo *M. avium* (da Silva Rocha *et al.*, 2002). Algunos hallazgos han sugerido que estas variantes PRA pueden diferir en cuanto a virulencia y transmisibilidad (Oliveira *et al.*, 2003).

Aunque el PRA es relativamente simple en comparación con otros métodos para la identificación de las micobacterias la sensibilidad y especificidad están influenciadas por un gran número de variables. Entre éstas, la interpretación de la posición de las bandas generadas por la restricción enzimática es una tarea compleja, afectada por la calidad de agarosa, las condiciones en que se realizó la electroforesis y la subjetividad de dicha interpretación (Leão *et al.*, 2005). Se suma que, los algoritmos para la identificación mediante PRA presentan variaciones y no siempre coinciden (Telenti *et al.*, 1993; Devallois *et al.*, 1997; Brunello *et al.*, 2001; Rastogi, 2003).

La interpretación conjunta con ciertas características fenotípicas podría mejorar la precisión en la identificación de las especies de micobacterias (Leão *et al.*, 2005).

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

La biodiversidad de las micobacterias ambientales y la descripción de nuevas especies causantes de micobacteriosis requieren de la complementación de las técnicas de identificación bioquímicas-fenotípicas con los métodos moleculares.

3.2 Objetivo general

Establecer el grado de concordancia entre las técnicas clásicas de identificación bioquímica-fenotípica y las técnicas de biología molecular (PRA), en la tipificación de las micobacterias ambientales provenientes de distintas fuentes de aguas.

3.3 Objetivos específicos

- Identificar las micobacterias ambientales aisladas de distintas fuentes de agua mediante pruebas bioquímicas y/o fenotípicas.
- Utilizar el análisis de los patrones de restricción para la identificación a nivel de especie de las micobacterias ambientales.
- Determinar si la identificación a nivel de especies de micobacterias ambientales con ambos métodos son concordantes.
- Identificar mediante secuenciación de un fragmento del 16S rARN o secuenciación del gen *hsp65* los aislamientos con resultados discordantes.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Muestreo

Se recolectaron muestras de agua de red de 8 sitios de la ciudad de General Pico, de 5 fuentes arquitectónicas pertenecientes a espacios públicos de dicha ciudad y de los 2 humedales de la zona de influencia, durante las estaciones climáticas extremas, verano e invierno, por un periodo de dos años consecutivos (desde invierno 2010 a verano 2012). La ubicación del muestreo se efectuó de acuerdo al criterio establecido por la Municipalidad de General Pico y la cooperativa de electricidad y agua potable (CORPICO). Los sitios de extracción que se establecieron para el muestreo del agua de red (círculos rojos) y de

fuentes arquitectónicas públicas (círculos verdes) se describen en la Figura 4. La ubicación de los sitios de toma de muestra de los humedales se detalla en las Figuras 6 y 7.

Se analizaron un total de 76 muestras: 32 de agua de red, 32 de humedales y 12 de fuentes públicas arquitectónicas. Las fuentes públicas seleccionadas fueron aquellas ubicadas en las plazas de la ciudad que concentran mayor número de personas. Los dos humedales que se muestrearon fueron los ubicados en el Reciclado de Residuos Urbanos (RRU) en el Km 68 de la ruta provincial N° 1 que ocupa una superficie con agua de aproximadamente 36 hectáreas y la laguna “La Arocena” ubicada a 5 Km al sudeste de la ciudad de General Pico, la cual constituye el principal desagüe pluvial de la ciudad, ocupa 40 hectáreas de superficie y es uno de los principales atractivos recreacionales de la ciudad donde se practica pesca deportiva y deportes náuticos (Figura 5).

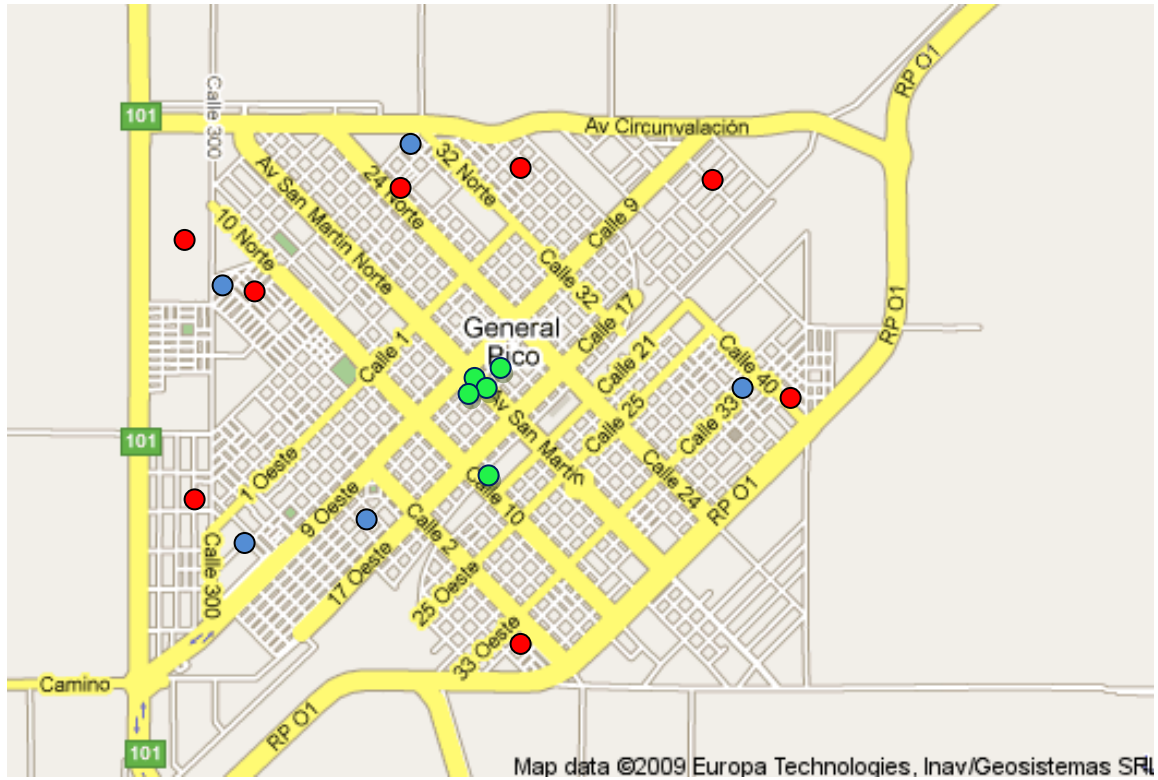


Figura 4: Mapa de la ciudad de General Pico que muestra la ubicación de los sitios de extracción de las muestras de agua de red y de los puntos de cloración del agua potable. ● (Círculos rojos) Sitio de extracción de muestras de agua de red (N°1: calle 102 N° 1799, N° 2: calle 40 N° 1866, N° 3: calle 103 N° 1835, N° 4: calle 24 N° 666 Norte, N° 5: calle 115 N° 216, N° 6: calle 308 N° 1915, N° 7: calle 302 N° 678, N° 8: calle 13 N° 2699) ● (Círculos azules) Sitios de cloración del agua utilizada en la ciudad (N°9: calle 7 y 120, N°10: calle 300 esq. 2, N°11: calle 33 esq. 40, N°12: calle 113 entre 28 y 30). ● (Círculos verdes) Sitios de extracción de agua de fuentes arquitectónicas (N°13: Av. San Martín y calle 9, N°14: Av. San Martín y calle 11, N° 15: Plaza San Martín, N°16: Plaza del Municipio, N°17: calle 10 esq. 21).

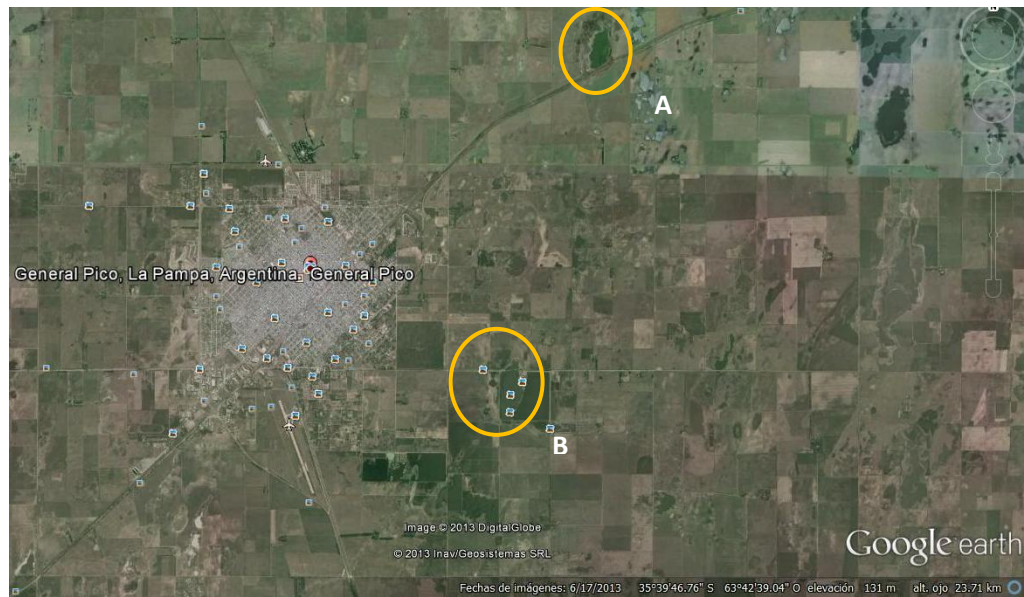


Figura 5: Foto satelital de la ciudad de General Pico y ubicación de los dos humedales en la zona de influencia utilizadas para actividades recreacionales. A: laguna RRU; B: laguna La Arocena. (Imagen obtenida de Google earth)



Figura 6: Foto satelital de la laguna La Arocena donde se detallan los sitios de muestreo. (Imagen obtenida de Google earth)



Figura 7: Foto satelital de la laguna RRU donde se detallan los sitios de muestreo. (Imagen obtenida de Google earth)

Cada muestra de agua de red se recolectó en recipientes con la cantidad suficiente para una concentración final de 18 mg L^{-1} de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), a fin de neutralizar hasta 5 mg L^{-1} de cloro residual y no interferir en el aislamiento bacteriano.

4.2 Descontaminación específica para las micobacterias.

4.2.1 Muestras de aguas de humedales y fuentes públicas arquitectónicas

La metodología recomendada para el procesamiento de aguas con alta carga de contaminantes se realizó de acuerdo al método de Fujimora Leite *et al.* (1989). Se filtraron 500 mL de agua a través de una membrana de $0,45 \mu\text{m}$, posteriormente se colocaron las membranas en 5 mL de caldo cerebro corazón (1/10), con perlas de vidrio (5 mm de diámetro) a 32°C durante 6 h, en agitación constante para el desprendimiento bacteriano. Transcurrido ese tiempo se descontaminó empleando partes iguales de H_2SO_4 4% por 10 min, se neutralizó con NaOH al 30%, se centrifugó a 3500 rpm durante 15 min y posteriormente el sedimento, luego de dos lavados con agua destilada estéril (ADE), se resuspendió en 2 mL de ADE. Finalmente la muestra procesada se sembró en medios apropiados.

4.2.2 Muestras de aguas de red

Para el procesamiento de aguas de red se empleó el Método de Kamala (Kamala *et al.*, 1994). Se filtraron 500 mL de la muestra a través de una membrana de 0,22 o 0,45 μm de tamaño de poro. Después de la filtración se colocó el filtro en un frasco con 10 mL de ADE y 2 o 3 perlas de vidrio de 5 mm de diámetro, en agitación mecánica durante 1 hora a 32°C. Posteriormente se descontaminó empleando cantidades iguales de NaOH al 1% y Lauril Sulfato de Sodio (SDS) al 3% durante 10 min, incubando a 32°C, transcurrido este tiempo se trasvasó el contenido a un tubo cónico, se centrifugó a 3.500 rpm 15 min, se descartó el sobrenadante y se reemplazó el mismo volumen por ADE, de esta forma se lavó 3 veces. Posteriormente se sembró la muestra en medios apropiados.

4.3 Aislamientos estudiados y cepas

En este estudio se incluyeron 56 aislamientos de MA recuperadas a partir de las muestras de agua descritas: 34 de aguas de humedales, 11 de fuentes arquitectónicas públicas y 11 de aguas de red. Las siguientes cepas de referencia, provenientes de colecciones de cultivos del ANLIS Dr. “Carlos G. Malbrán”, se utilizaron como control durante la ejecución de las pruebas bioquímicas para micobacterias: *M. avium* 21739, *M. intracellulare* 21799, *M. kansasii* 21849, *M. gordonae* 21823, *M. chelonae* 21762, *M. scrofulaceum* 12806, *M. fortuitum* 21851, *M. smegmatis* 19420 y *M. terrae* 18950.

4.4 Medios y condiciones de cultivo

Las muestras se sembraron por duplicado en los medios Löwenstein Jensen, Stonebrink y Herrold con micobactina elaborados en nuestro laboratorio y cuyo procedimiento se detalla en el Anexo 2. La incubación se realizó a distintas temperaturas: 25, 32 y 42°C, durante 3 meses.

4.5 Caracterización fenotípica

A todos los aislamientos se les realizaron las siguientes pruebas bioquímicas y/o fenotípicas, según la metodología descrita en el Manual de Diagnóstico de Micobacterias de importancia en Medicina Veterinaria, Comisión Científica de Micobacterias, (Jorge *et al.*, 2005) y en el Manual de procedimientos de SENASA (Bernardelli, 2007): crecimiento a 25, 32 y 42 °C; evaluación de la producción de pigmentos; crecimiento en presencia de hidroxilamina; tolerancia al NaCl 5%; catalasa semicuantitativa; catalasa a 68°C, reducción

de nitratos a nitritos; ureasa; pirazinamidasas; arilsulfatasas 3 días y arilsulfatasas 2 semanas; β -galactosidasas, hidrólisis del Tween 80 en 5 días y 10 días, toma de hierro, reducción de telurito en 7 días y 9 días y utilización de fuentes de carbono (manitol, citrato). El procedimiento y la elaboración de los medios de cultivo correspondientes se detallan en el Anexo 3.

4.6 Método PRA (PCR-Restriction Enzyme Analysis)

Se utilizó la metodología descrita por Telenti *et al.* (1993).

Extracción de ADN mediante lisis rápida: se resuspendió una ansada de bacterias a partir de colonias aisladas por cultivo, en 200 μ L de agua apirogénica estéril libre de ADNasas contenidos en un tubo con tapa de 1,5 mL de capacidad, se incubó a 95°C en termobloque (con agitación) durante 40 minutos. Luego se centrifugó 5 minutos a 12.000 rpm.

Amplificación de hsp65: 5 μ L del lisado de bacterias obtenido en el paso anterior, se adicionó a cada tubo de reacción. La mezcla para la amplificación de *hsp65* consistió en: buffer (Tris-HCl 10mM, pH 9,0; KCl 50mM, y Tritón X-100 al 0,1%), 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP, 25 pmoles de cada *primer*, Tb11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT) y Tb12 (5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT), 5 μ L de templado y 1,25U de Taq Polimerasa (Go Taq^R, Promega Corp., USA), en un volumen final de 50 μ L. La reacción fue sujeta a una desnaturalización inicial de 96°C 3 minutos seguida luego por 45 ciclos de amplificación (1 minuto a 96°C, 1 minuto a 60°C, 1 minuto a 72°C) y 7 minutos de extensión a 72°C. Se utilizó un termociclador PTC-100 (MJ Reserch, Inc USA). Los iniciadores Tb11 y Tb12 amplifican un fragmento de 439 pb entre las posiciones 398 y 836 de la secuencia del gen.

Electroforesis horizontal en agarosa: Para comprobar que la amplificación se llevó a cabo correctamente, 10 μ L del producto de PCR se sometió a electroforesis horizontal en agarosa al 1% en Buffer TAE (Tris acético EDTA) o TBE (Tris borato EDTA), con bromuro de etidio (0,5 μ L/mL). La visualización se realizó por exposición del gel en un transiluminador de luz UV.

Digestión enzimática: Se digirió 10 μ L del producto de PCR con cada una de las enzimas de restricción *BstEII* y *HaeIII* por separado, en un volumen de reacción de 20 μ L. La digestión con la enzima *BstEII* se realizó a 60°C mientras que con *HaeIII* a 37°C, durante 12 h.

Mezcla para la reacción enzimática: Buffer 2 µL, enzima 0,5 µL, producto de PCR 10 µL, agua 7,5 µL (volumen final 20 µL).

Separación de los fragmentos de la restricción enzimática: Se preparó un gel de agarosa al 4% en Buffer TBE 1X, con bromuro de etidio (0,5 µL/mL). Para ello se utilizó agarosa de alta pureza (Agarose 1000, Invitrogen Life Technologies) para lograr una buena resolución. Se sembraron 3 calles del gel (extremos y medio) con marcador de peso molecular de 50 pb (Cincuenta Marker, Biodynamincs, Argentina). La corrida electroforética se realizó a 100 voltios durante 4 horas. La visualización y registro fotográfico se realizó por exposición del gel en un transiluminador de luz UV (Gel Doc, BioRad).

Interpretación: La determinación del tamaño de los ADN generados por la digestión con las enzimas *BstEII* y con *HaeIII*, se realizó por comparación con el patrón de bandas de un marcador de peso molecular conocido. Los tamaños de los fragmentos de restricción se determinaron con ayuda del programa BioNumerics (Applied Maths, Bélgica). Determinados éstos, con la ayuda de un algoritmo (Telenti *et al.*, 1993; Devallois *et al.*, 1997) (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>) se buscaron los tamaños aproximados, comenzando con los fragmentos obtenidos con la enzima de restricción *BstEII* y luego con *HaeIII*, para determinar así la especie de micobacteria.

4.7 Secuenciación del gen *hsp65* y de un fragmento del 16S rARN

hsp65: Se secuenció el producto de PCR obtenido para la realización de PRA (luego de su purificación descrita más adelante), utilizando los oligonucleótidos Tb11 y Tb12.

16S rARN: Se amplificó un fragmento de 1.037 bp utilizando los *primers* 285 (5'GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') y 264 (5'TGCACACAGGCCACAAGGGA 3') (Kirshner y Böttger, 1998). La mezcla de reacción fue idéntica a la descrita en el ítem 4.6 y la amplificación se realizó en un termociclador PTC-100 (MJ Reserch, Inc USA) con el siguiente programa: desnaturalización inicial de 96°C 3 minutos seguida luego por 35 ciclos de amplificación (1 minuto a 96°C, 1 minuto a 55°C, 2 minutos a 72°C) y 10 minutos de extensión a 72°C. Para la secuenciación se utilizaron los oligonucleótidos 271 (5'CTTAACACATGCAAGTCGAAC 3') y 259 (5'TTTCACGAACAACGCGACAA 3') (Kirshner y Böttger, 1998) (Figura 8).

	Nombre y posición ^a	Secuencia nucleotídica 5'-3'
	Primers de amplificación	
285	(9-30)	GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG
264	(1046-1027)	TGC ACA CAG GCC ACA AGG GA
	Primers de secuenciación	
271	(51-71)	CTT AAC ACA TGC AAG TCG AAC
244	(361-341)	CCC ACT GCT GCC TCC CGT AG
259	(609-590)	TTT CAC GAA CAA CGC GAC AA

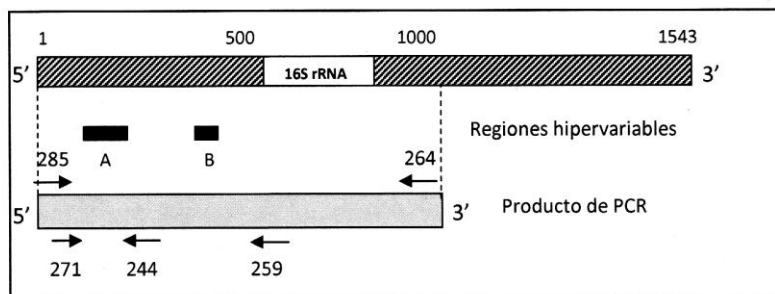


Figura 8: Localización de regiones hipervariables y primers empleados para el estudio del gen 16S rARN (Kirschner y Böttger, 1998).

Purificación de los productos de PCR: Los productos de PCR obtenidos se purificaron mediante el empleo del kit “Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare, UK”, siguiendo las especificaciones del fabricante.

Cuantificación: Se cuantificaron los productos de PCR purificados en espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm (Nanodrop 2000, Thermo Scientific, USA).

Secuenciación: Se realizó en un secuenciador de 16 capilares ABI3130xl (Applied Biosystems), utilizando “Big Dye Terminator v3.1”(Cycle Sequencing Kit), en la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología, de INTA Castelar.

Análisis de las secuencias: Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las incluidas en la base de datos *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y *Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms* (RIDOM) (<http://rdna.ridom.de/>).

5. RESULTADOS

5.1 Identificación de MA mediante pruebas bioquímicas

Los 56 aislamientos BAAR recuperados a partir de muestras de agua, se estudiaron fenotípicamente mediante pruebas bioquímicas convencionales descritas para micobacterias ambientales detalladas en el Anexo 3. Los resultados que se resumen en las tablas 3 y 4, fueron comparados con los datos presentados en el Volumen V del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2^oed (Withman *et al.*, 2012). Considerando la primera línea de identificación fenotípica 37 aislamientos de micobacterias se clasificaron de rápido crecimiento y 19 micobacterias de lento crecimiento. De acuerdo a la pigmentación de la colonia se discriminaron en 25 escotocromógenas, 16 no cromógenas y 15 fotocromógenas. Las características fenotípicas estudiadas de las micobacterias aisladas no permitieron en un principio identificar aquellos aislamientos de rápido crecimiento y pigmentados, pero sí a la mayoría de los aislamientos de lento crecimiento y/o no pigmentados. Las técnicas moleculares proporcionaron la base para la correcta identificación bioquímica de los distintos aislamientos ambientales. Asimismo los datos alcanzados por métodos convencionales para 15 cepas no coincidieron con ninguna especie propuesta por las técnicas moleculares realizadas (*PCR-Restriction Enzyme Analysis*, secuenciación de un fragmento del gen 16S rARN o secuenciación *hsp65*).

Tabla 3: Resultados de las pruebas bioquímicas de 45 cepas de MA recuperadas a partir de humedales y fuentes públicas arquitectónicas.

cepa	vel.	42°	45°	pigmen.	CIN a 5% NO3	T 3D	T 9D	AS 3D	AS 10D	C 68°C	C SC	tw 80 5d	tw 80 10d	urea	PZA	beta-G	HA 500	Fe	manitol	citrato	especie
24	R	nd	-	Esc	+	+	+	-	-	nd	nd	-	+	+	nd	-	-	-	+	-	<i>M.davalli</i>
28	R	-	-	Esc	+	+	+	-	-	nd	nd	-	+	+	nd	-	-	+	-	+	<i>M.poriferae</i>
29A	R	nd	-	F	+	+	+	-	+	nd	nd	-	-	+	nd	-	-	+	+	nd	<i>M. vaccae</i>
29B	R	nd	-	Es	+	-	-	-	-	nd	-	nd	nd	+	+	nd	-	nc	+	-	<i>Mycobacterium sp.</i>
30	R	-	-	F	+	+	+	-	+	nd	nd	-	-	+	+	nd	-	+	nd	nd	<i>M.vaccae</i>
44A	L	-	-	Esc	-	nd	nd	-	+	+	+	+	-	-	-	nd	+	-	nd	nd	<i>M.gordonae</i>
44B	L	-	-	Esc	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	nd	nd	<i>M.gordonae</i>
47A	R	-	-	F	-	+	+	-	+	+	nd	nd	nd	-	+	nd	-	+	nd	nd	<i>M.vaccae</i>
47B	R	-	-	F	-	+	+	-	+	+	nd	nd	nd	-	+	nd	-	+	nd	nd	<i>M.vaccae</i>
48B	R	-	-	F	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	nd	-	+	nd	nd	<i>M.vaccae</i>
48C	R	+	-	F	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	nd	-	+	nd	nd	<i>M.vaccae</i>
52B	R	-	-	Esc	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	nc	-	+	<i>M.aurum</i>
53A	R	-	-	Esc	+	+	+	-	+	+	nd	+	+	+	+	nd	-	+	nd	nd	<i>M.davalli</i>
53B	R	-	-	Esc	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	nd	-	+	nd	nd	<i>M.aurum</i>
77A	R	-	-	Esc	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	nd	-	+	nd	nd	<i>M.aurum</i>
77B	R	+	nd	F	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	nd	-	-	nd	nd	<i>Mycobacterium sp.</i>
77C	R	+	nd	F	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	nd	-	-	nd	nd	<i>Mycobacterium sp.</i>
77D	R	-	-	Esc	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	nd	-	+	nd	nd	<i>M.aurum</i>
78A	R	+	nd	F	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	nd	-	+	nd	nd	<i>Mycobacterium</i>
78B	R	-	-	Esc	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	nd	-	-	nd	nd	<i>Mycobacterium sp.</i>
78C	R	-	-	Esc	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	nd	-	-	nd	nd	<i>Mycobacterium sp.</i>
78E	L	-	-	N	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	nd	+	-	nd	nd	<i>Maripense</i>
78G	R	-	-	Esc	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	nd	-	-	nd	nd	<i>Mycobacterium</i>
78F	L	-	-	N	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	nd	+	-	nd	nd	<i>Maripense</i>
79A	R	-	-	F	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	nd	-	+	nd	nd	<i>M.vaccae</i>
79B	R	-	-	N	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	nd	-	+	+	+	<i>M.fortitium/M. peregrinum</i>
80A	L	-	-	Esc debil	-	nc	nc	-	-	nd	-	-	-	+	+	nd	-	nc	nd	nd	<i>Mycobacterium sp.</i>
80B	R	+	-	F	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	nd	-	+	nd	nd	<i>M.vaccae</i>
80C	R	+	nd	F	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	nd	-	-	nd	nd	<i>Mycobacterium sp.</i>

Tabla 3: Resultados de las pruebas bioquímicas de 45 cepas de MA recuperadas a partir de humedales y fuentes públicas arquitectónicas. (Continuación)

cepa	vel.	42°	45°	pigmen.	CINa 5% NO3	T 3D	T 9D	AS 3D	AS.10D	C 68°C	C SC	tw 80 5d	tw 80 10d	urea	PZA	beta-G	HA 500	Fe	manitol	citrato	especie
80D	L	-	-	Esc	-	-	-	nd	nd	nd	+	+	+	-	nd	nd	+	+	nd	nd	<i>M.gordonae</i>
83A	R	-	-	Esc	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	-	+	nd	nd	<i>M.aurum</i>
83C	M	-	-	Esc	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	nd	-	-	nd	nd	<i>Mycobacterium sp.</i>
83D	M	-	-	F	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	nd	-	-	nd	nd	<i>Mycobacterium sp.</i>
86	M	-	-	Esc	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	nd	-	-	nd	nd	<i>Mycobacterium sp.</i>
87A	R	-	-	N	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	nd	+	+	+	-	<i>M.peregrinum</i>
87B	R	-	-	Esc/F	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	-	+	nd	nd	<i>M.parafortitium</i>
88A	M	-	-	Esc debil	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	nd	-	+	nd	nd	<i>M.aurum</i>
88B	L	-	-	N	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	nd	+	-	nd	nd	<i>M.arupense</i>
88C	L	-	-	N	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	nd	+	-	nd	nd	<i>M.arupense</i>
88D	L	-	-	F	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	nd	+	-	nd	nd	<i>M.asiaticum</i>
89A	R	-	-	N	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	nd	+	+	+	-	<i>M.peregrinum</i>
89B	R	-	-	Esc	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	nd	-	+	nd	nd	<i>M.clorophenolicum</i>
89C	R	-	-	Esc	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	-	+	nd	nd	<i>M.clorophenolicum</i>
90A	L	-	-	Esc	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	nd	+	-	nd	nd	<i>M.gordonae</i>
90B	R	-	-	N	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	nd	+	+	+	-	<i>M.fortitium</i>

24 a 80D constituyen aislamientos recuperados a partir de muestras de humedales y de 83A a 90B aislados de fuentes públicas arquitectónicas
 vel: velocidad de crecimiento
 Pigm: Esc: escotocromógenas; F: fotocromógenas; N: no cromógenas
 T3D: reducción de telurito a los 3 días; T9D: reducción de telurito a los 9 días
 C 68°C: catalasa después de incubar a 68°C 10 min.; CSC: catalasa semicuantitativa
 Fe: toma de hierro
 beta-G: beta-galactosidasa
 AS3D: arilsulfatasa 3 días; AS28: arilsulfatasa 2 semanas
 nd: no determinado; nc: no creció.
 HA: crecimiento en presencia de hidroxilamina
 PZA: pirazinamida
 tw80 5d; tw80 10d: hidrólisis del tween 80 en 5 días y 10 días
 manitol; citrato: utilización como única fuente de carbono

Tabla 4: Resultados de las pruebas bioquímicas de 11 cepas de MA recuperadas a partir de aguas de red

cepa	vel	42°	45°	pigmen	CINa 5%	NO3	T 3d	T 9d	AS3d	AS2S	C 68°C	C SC	tw80 5d	tw80 10d	urea	PZA	beta-G	HA 500	Fe	manitol	citrato	Identificación
1	R	-	N	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	+	+	-	-	<i>M. fortuitum</i>
5	R	-	Esc	-	-	nc	nc	nc	+	+	nc	nc	nc	nc	+	nd	nd	-	+	nd	nd	<i>M. neoaurum</i>
6	R	-	N	+	-	nc	nc	nc	+	+	+	nd	-	-	+	nd	-	+	+	nd	nd	<i>Mycobacterium spp</i>
34	L	-	Esc	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	nd	nd	-	-	nd	nd	<i>M. goodii</i>
54	L	-	Esc	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	nd	nd	-	-	nd	nd	<i>M. goodii</i>
69	M	-	N	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	nd	+	+	-	nd	nd	<i>M. nonchromogenicum</i>
71	R	-	N	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	nd	+	+	+	+	<i>M. porcinum</i>
73	M	-	N	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	<i>M. nonchromogenicum</i>
74	R	-	N	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	nd	+	-	+	-	<i>M. peregrinum/fortuitum</i>
75	L	-	N	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	nd	+	+	nd	nd	<i>Mycobacterium spp</i>
76	R	-	N	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	<i>Mycobacterium spp.</i>

vel: velocidad de crecimiento

Pigm: Esc: escotocromógenas; F: fotocromógenas; N: no cromógenas

42°C: crecimiento a 42°C y 45°C: crecimiento a 45°C

HA: crecimiento en presencia de hidroxilamina

PZA: pirazinamida

tw80 5d; tw80 10d: hidrólisis del tween 80 en 5 días y 10 días

manitol; citrato: utilización como única fuente de carbono

T3D: reducción de telurito a los 3 días; T1D: reducción de telurito a los 9 días

C 68°C: catalasa después de incubar a 68°C 10 min.; CSC: catalasa semicuantitativa

Fe: toma de hierro

beta-G: beta-galactosidasa

AS3D: arilsulfatasa 3 días; AS2S: arilsulfatasa 2 semanas

nd: no determinado; nc: no creció.

5.2 Identificación de MA por PRA (PCR-Restriction Enzyme Analysis)

Todos los aislamientos fueron estudiados molecularmente por la técnica de PRA según la metodología desarrollada por Telenti *et al.* (1993), a partir de un cultivo puro. Los mismos se pueden observar en las Figuras 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 y 17 que muestran las corridas electroforéticas en geles de agarosa al 4%, luego de la digestión con enzimas de restricción de *BstEII* y *HaeIII*. Las cepas de referencia utilizadas fueron *M. avium* (Ma) y *M. bovis* (Mb).

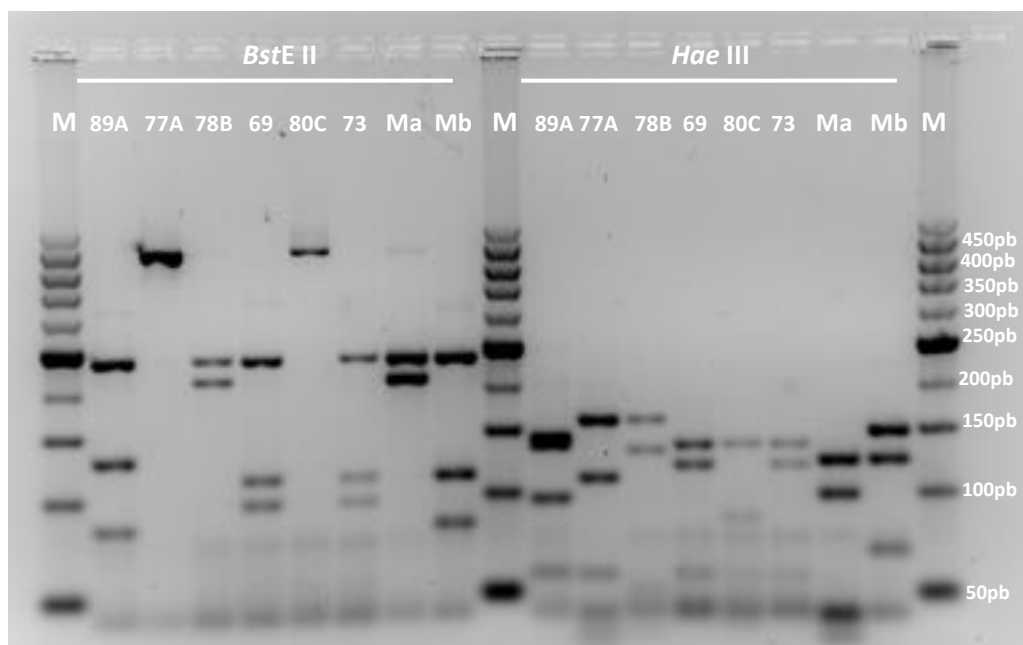


Figura 9: Patrones de PRA: gel de agarosa con los fragmentos de restricción obtenidos con las enzimas *HaeIII* y *BstEII*, de las cepas 89A, 77A, 78B, 69, 80C y 73. M: Marcador de peso molecular Cincuenta Marker (Biodynamincs, Argentina). Cepas de referencia: *M. avium* (Ma) y *M. bovis* (Mb).

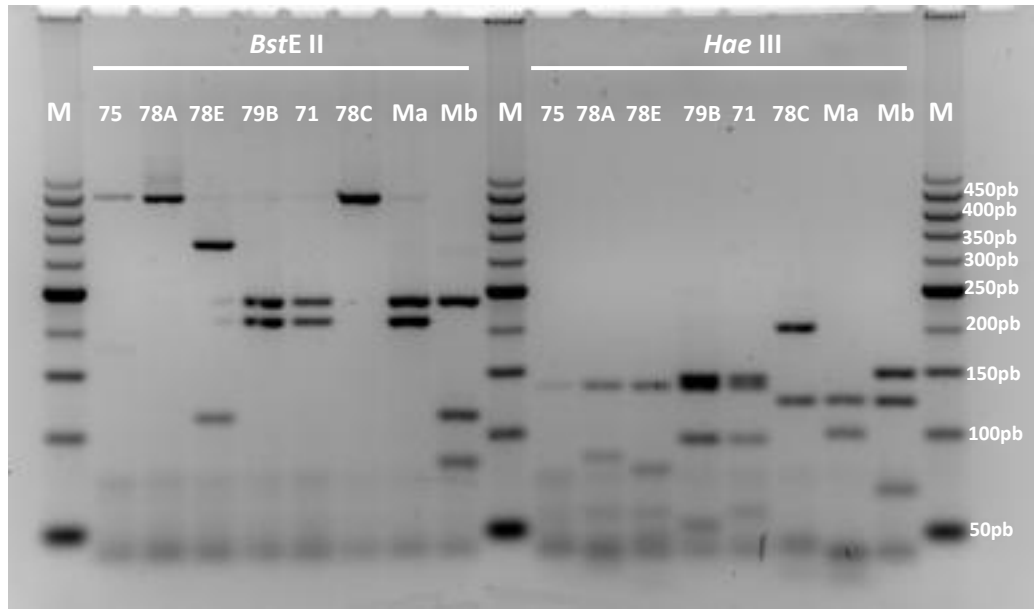


Figura 10: Patrones de PRA: gel de agarosa con los fragmentos de restricción obtenidos con las enzimas *Hae*III y *Bst*EII de las cepas 75, 78A, 78E, 79B, 71 y 78C. M: Marcador de peso molecular Cincuenta Marker (Biodynamincs, Argentina). Cepas de referencia: *M. avium* (Ma) y *M. bovis* (Mb).

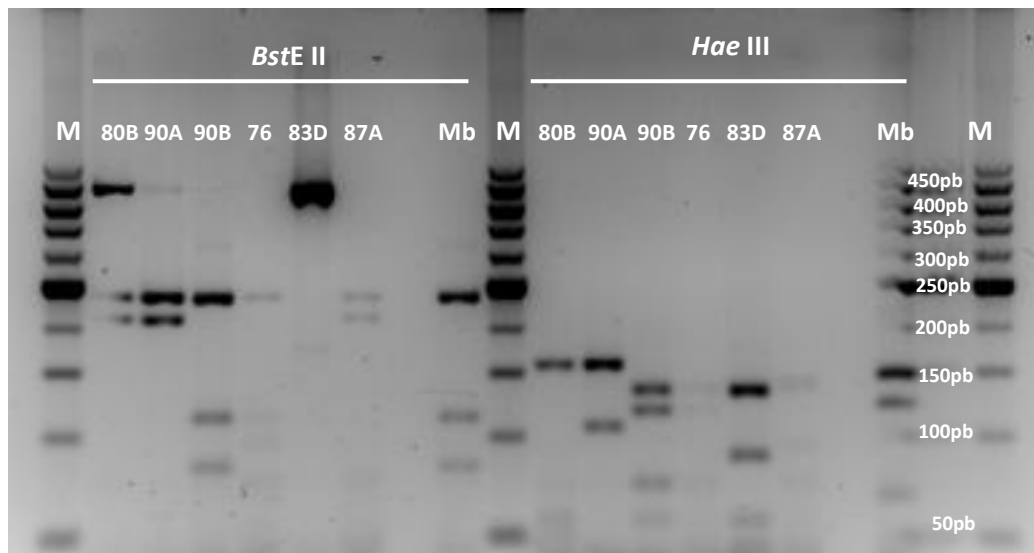


Figura 11: Patrones de PRA: gel de agarosa con los fragmentos de restricción obtenidos con las enzimas *Hae*III y *Bst*EII de las cepas 80B, 90A, 90B, 76, 83D y 87A. M: Marcador de peso molecular Cincuenta Marker (Biodynamincs, Argentina). Cepa de referencia: *M. bovis* (Mb).

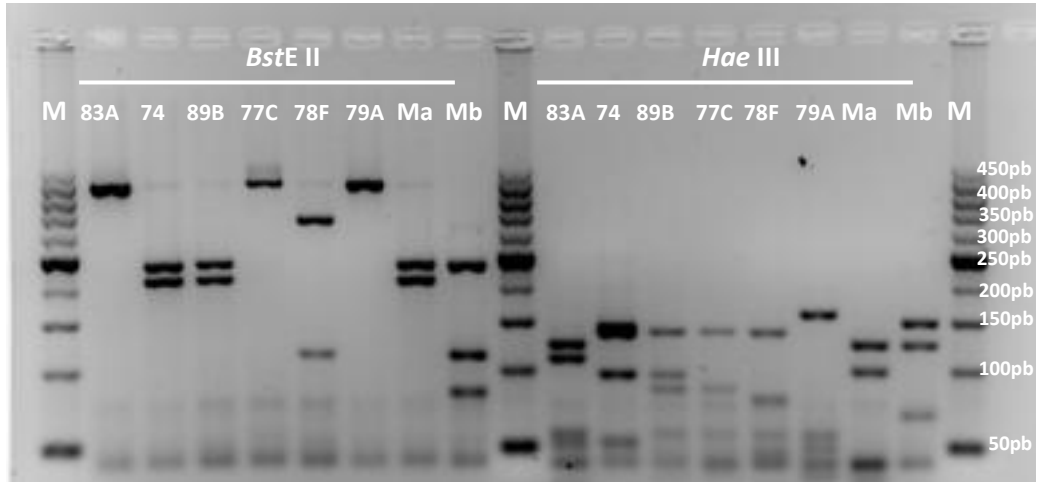


Figura 12: Patrones de PRA: gel de agarosa con los fragmentos de restricción obtenidos con las enzimas *Hae*III y *Bst*EII de las cepas 83A, 74, 89B, 77C, 78F y 79A. M: Marcador de peso molecular Cincuenta Marker, (Biodynamincs, Argentina). Cepas de referencia: *M. avium* (Ma) y *M. bovis* (Mb).

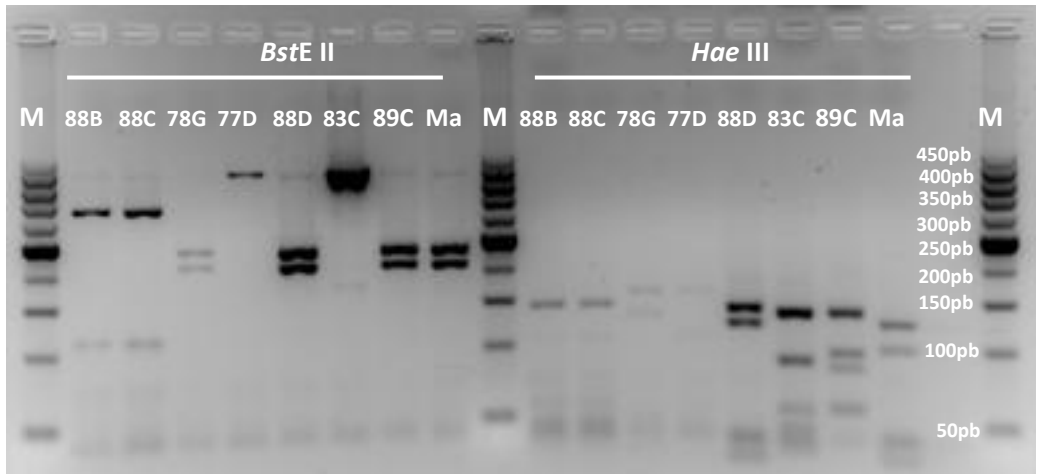


Figura 13: Patrones de PRA: gel de agarosa con los fragmentos de restricción obtenidos con las enzimas *Hae*III y *Bst*EII de las cepas 88B, 88C, 78G, 77D, 83C y 89C. M: Marcador de peso molecular Cincuenta Marker, (Biodynamincs, Argentina). Cepa de referencia: *M. avium* (Ma).

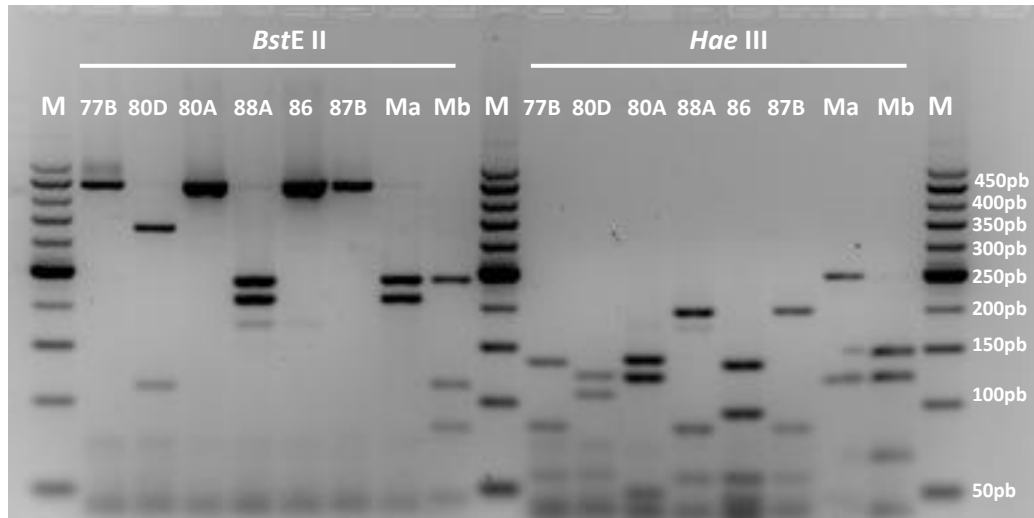


Figura 14: Patrones de PRA: gel de agarosa con los fragmentos de restricción obtenidos con las enzimas *Hae*III y *Bst*EII de las cepas 77B, 80D, 80A, 88A, 86 y 87B. M: Marcador de peso molecular Cincuenta Marker, (Biodynamincs, Argentina). Cepas de referencia: *M. avium* (Ma) y *M. bovis* (Mb).

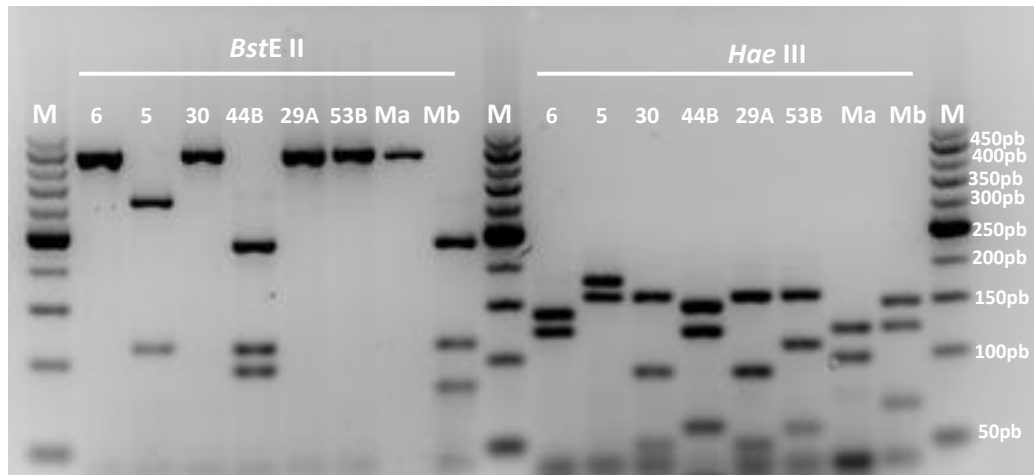


Figura 15: Patrones de PRA: gel de agarosa con los fragmentos de restricción obtenidos con las enzimas *Hae*III y *Bst*EII de las cepas 6, 5, 30,44B, 29A y 53B. M: Marcador de peso molecular Cincuenta Marker (Biodynamincs, Argentina). Cepas de referencia: *Mycobacterium avium* (Ma) y *Mycobacterium bovis* (Mb).

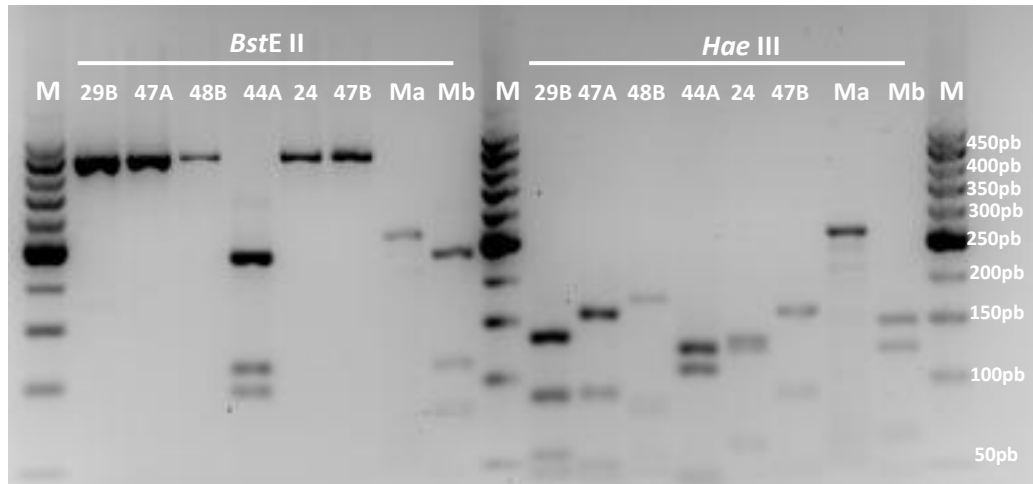


Figura 16: Patrones de PRA: gel de agarosa con los fragmentos de restricción obtenidos con las enzimas *Hae*III y *Bst*EII de las cepas 29B, 47A, 48B, 44A, 24 y 47B. M: Marcador de peso molecular Cincuenta Marker, (Biodynamincs, Argentina). Cepas de referencia: *Mycobacterium avium* (Ma) y *Mycobacterium bovis* (Mb).

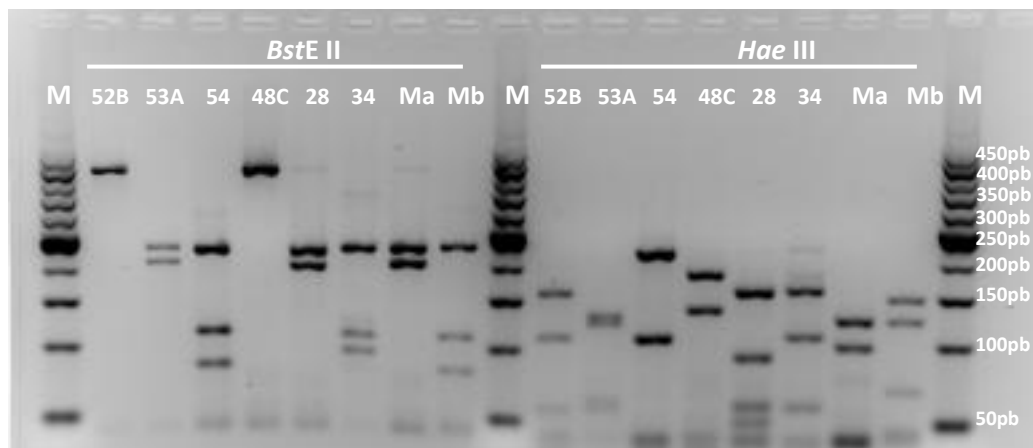


Figura 17: Patrones de PRA: gel de agarosa con los fragmentos de restricción obtenidos con las enzimas *Hae*III y *Bst*EII de las cepas 52B, 53A, 54, 48C, 28 y 34. M: Marcador de peso molecular Cincuenta Marker, (Biodynamincs, Argentina). Cepas de referencia: *Mycobacterium avium* (Ma) y *Mycobacterium bovis* (Mb).

La identificación de los aislamientos comenzó con el análisis de los patrones de restricción obtenidos por PRA según el algoritmo del sitio <http://app.chuv.ch/prasite/index.html> (Tabla 5). Estos resultados fueron comparados con los obtenidos por pruebas bioquímicas y análisis del fenotipo, especialmente en aquellos casos en que los patrones son comunes a distintas especies o cuyo patrón se aproxima al disponible en la base de datos. La utilización independiente de cada método no permitió establecer de manera certera la identificación de especie, ya sea por la falta de resultados

estandarizados para algunas pruebas bioquímicas que distinguen a las diferentes especies, como así también por el hecho que muchas de ellas, que pertenecen a diferentes grupos de Runyon (fenotipo básico), comparten el mismo patrón de PRA o son bioquímicamente muy similares.

Es importante destacar que en 6 muestras de agua se recuperaron en cada una de ellas la misma micobacteria (47A y 47B, 77A y 77D, 77B y 77C, 78G y 78B, 78E y 78F, 83C y 83D, 88B y 88C, 89B y 89C), a distintas temperaturas y en distintos medios de cultivo, coincidiendo entre ellas el patrón PRA y el perfil bioquímico lo que muestra la reproducibilidad de los resultados (Figuras 9 a 17, tablas 3 y 4).

Se observó además, que algunas cepas se pudieron asociar a un nicho ecológico en particular ya que una determinada especie se aisló en más de una muestra a partir de un mismo origen, pues los patrones de PRA y pruebas bioquímicas fueron coincidentes (86 y 83C; 77B, 78A y 80C; 79A y 80B; 69, 73 y 76).

Tabla 5: Identificación de 56 cepas de MA mediante PRA. Patrones de restricción obtenidos para cada uno de los aislamientos y su correspondencia según la base de datos publicada en PRASITE.

ORIGEN	CEPA	PATRONES OBTENIDOS		PATRONES PUBLICADOS		IDENTIFICACIÓN
		<i>BstEII</i>	<i>HaeIII</i>	<i>BstE II</i>	<i>Hae III</i>	
RED	1	No amplificó ^A				
RED	5	327/113	178/158	320/115	170/140	<i>M.neoaurum</i> tipo 1/ <i>M.parafortuitum</i> tipo 2
RED	6	440	139/122	440	145/130	<i>M.florentinum</i> tipo 1/ <i>M.lentiflavum</i> tipo 1
RRU	24	440	129/58	440	135/130/65	<i>M. duvalii</i> tipo 1
RRU	28	239/210	163/93/58/50	235/210	160/95/50	<i>M. poriferae</i> tipo 1
AROCENA	29A	440	156/88/50	440	160/90/60	<i>M.vaccae</i> tipo1
AROCENA	29B	440	135/88/54	440	145/90/60	<i>M. komassense</i> / <i>M. parafortuitum</i> tipo 1
AROCENA	30	440	158/89/50	440 440	160/90/60 160/85/55	<i>M.vaccae</i> tipo1 <i>M. flavescens</i> tipo 3
RED	34	240/116/100	163/93/58/50	235/120/100	160/115/60	<i>M.gordonae</i> tipo 9
AROCENA	44A	242/112/95	124/107	235/120/100	130/115	<i>M.gordonae</i> tipo 3
AROCENA	44B	235/111/94	145/121/57	235/120/100	160/115/60	<i>M.gordonae</i> tipo 9
AROCENA	47A	440	159/90/50	440 440	160/85/55 160/90/60	<i>M.flavescens</i> tipo3 <i>M.vaccae</i> tipo1
AROCENA	47B	440	158/88/50	440 440	160/85/55 160/90/60	<i>M.flavescens</i> tipo3 <i>M.vaccae</i> tipo1
RRU	48B	440	175/80/60	440	160/90/60	<i>M.vaccae</i> tipo1
RRU	48C	440	188/140	440	180/145	<i>M.gilvum</i> tipo1

ORIGEN	CEPA	PATRONES OBTENIDOS		PATRONES PUBLICADOS		IDENTIFICACIÓN
		<i>BstEII</i>	<i>HaeIII</i>	<i>BstE II</i>	<i>Hae III</i>	
RRU	52B	440	160/110/57	440	160/90/60	<i>M.vacciae</i> tipo 1
				440	130/115/70/60	<i>M.aurum</i> tipo 2
RRU	53A	245/215	132/127/60/55	235/210	140/125/60/50	<i>M.senegalense</i> tipo 2
RRU	53B	440	156/108/56	440	130/115/70/60	<i>M.aurum</i> tipo 2
RED	54	240/118/86	225/110	235/120/85	215/110/0	<i>M.gordonae</i> tipo 2
RED	69	244/112/95	136/120/57	235/120/85	140/120/60	<i>M.fortuitum</i> tipo 2
RED	71	237/212	140/138/96/57	235/210	140/125/100/50	<i>M.porcinum</i> tipo 1/ <i>M. peregrinum</i> tipo2/ <i>M. septicum</i> tipo1
RED	73	244/115/96	136/120/60	235/120/85	140/120/60	<i>M.fortuitum</i> tipo 2
RED	74	243/218	141/130/98/52	235/210	140/125/100/50	<i>M.porcinum</i> tipo 1/ <i>M. peregrinum</i> tipo 2/ <i>M. septicum</i> tipo1
RED	75	440	137/72/55	440	145/70/60	<i>M.brumae</i> tipo1
RED	76	240/100/74	136/120/60	235/120/85	140/120/60/55	<i>M.fortuitum</i> tipo 2
RRU	77A	440	160/110/56	440	160/90/60	<i>M.vacciae</i> tipo1
				440	130/115/70/60	<i>M.aurum</i> tipo 2
RRU	77B	440	135/83/56	440	145/90/60	<i>M. parafortuitum</i> tipo 1/ <i>M.komossense</i> tipo1
RRU	77C	440	140/85/56	440	145/90/60	<i>M.parafortuitum</i> tipo 1/ <i>M.Komossense</i> tipo1
RRU	77D	440	160/114/60	440	160/90/60	<i>M.vacciae</i> tipo1
				440	130/115/70/60	<i>M.aurum</i> tipo 2
RRU	78A	440	134/85/56	440	145/90/60	<i>M.parafortuitum</i> tipo 1/ <i>M.komossense</i> tipo1
RRU	78B	245/215	160/132	235/210	155/140	<i>M.simiae</i> tipo2
RRU	78C	440	202/125	440	180/145	<i>M.gilvum</i> tipo1
RRU	78E	340/113	138/78/56	320/115	145/75/60	<i>M. arupense</i> type 1
RRU	78F	354/119	138/77/56	320/115	145/75/60	<i>M. arupense</i> type 1
RRU	78G	244/213	166/134	235/210	155/140	<i>M.simiae</i> tipo 2
RRU	79A	440	160/56	440	160/60/50	<i>M. novocastrense</i> tipo1
RRU	79B	237/212	142/138/96/52	235/210	145/125/100/50	<i>M.porcinum</i> tipo1/ <i>M.peregrinum</i> tipo 2/ <i>M.septicum</i> tipo 1
RRU	80A	440	136/120	440	145/130	<i>M.lentiflavum</i> / <i>M. florentinum</i> / <i>M.simiae</i> tipo 5
RRU	80B	440	158/56	440	160/60/50	<i>M.novocastrense</i> tipo 1
RRU	80C	440	137/84/72/55	440	145/90/60	<i>M.parafortuitum</i> tipo 1/ <i>M.komossense</i> tipo1
RRU	80D	335/113	122/107/56	320/115	130/115/60	<i>M. gordonae</i> tipo 4
AROCENA	83A	440	126/112/57/53	440	130/115/70/ 60	<i>M.aurum</i> tipo 2
AROCENA	83C	440	136/90/56	440	145/90/60	<i>M.parafortuitum</i> tipo1/ <i>M.komossense</i> tipo1
AROCENA	83D	440	135/89/55	440	145/90/60	<i>M.parafortuitum</i> tipo1/ <i>M.komossense</i> tipo1
AROCENA	86	440	132/92/55	440	145/90/60	<i>M.parafortuitum</i> tipo1/ <i>M.komossense</i> tipo1
FUENTE	87A	244/214	145/141/96/74	235/210	145/140/100/50	<i>M. peregrinum</i> tipo 1

ORIGEN	CEPA	PATRONES OBTENIDOS		PATRONES PUBLICADOS		IDENTIFICACIÓN
		<i>BstEII</i>	<i>HaeIII</i>	<i>BstE II</i>	<i>Hae III</i>	
FUENTE	87B	440	197/82/55	440	195/90/60	<i>M.confluentis</i> tipo 1
FUENTE	88A	238/210	195/81/55	235/210	200/90/60	<i>M.moriokaense</i> tipo 1
FUENTE	88B	355/113	145/108/75/56	320/115	130/110/70	<i>M.kumamotonense</i> tipo 1
FUENTE	88C	349/112	146/108/73/54	320/115	130/110/70	<i>M.kumamotonense</i> tipo 1
FUENTE	88D	237/209	142/125	235/210	115/105	<i>M.asiaticum</i> tipo 1
FUENTE	89A	244/128/80	145/141/96/57	235/130/85	145/140/100/60	<i>M.peregrinum</i> tipo 3
FUENTE	89B	249/220	140/97/86/57	235/210	140/80/60/55	<i>M.parascrofulaceum</i> tipo 3
FUENTE	89C	240/215	137/97/85/57	235/210	140/80/60/55	<i>M.parascrofulaceum</i> tipo 3
FUENTE	90A	240/210	160/108	235/210	145/105	<i>M.bohemicum</i> tipo 1
FUENTE	90B	240/113/82	135/119/72/56	235/120/85	140/120/60/55	<i>M.fortuitum</i> tipo 2

^A: no se obtuvo una amplificación de concentración suficiente para ser digerida con las enzimas de restricción y se puedan observar los productos de la restricción. RRU: laguna de reciclado residuos urbanos, Arocena: laguna la Arocena. FUENTE: fuente arquitectónica pública.

Entre la técnica del PRA y la identificación fenotípica se encontró una concordancia del 48,21%. En la tabla 6 se resumen los resultados coincidentes entre ambas técnicas.

Es necesario señalar que las cepas 74 y 79A bioquímicamente fueron compatibles con *M. peregrinum* o *M. fortuitum* y de acuerdo a la técnica de PRA se identificaron como *M.peregrinum*, *M.porcinum* o *M.septicum* ya que las tres especies comparten el mismo patrón de restricción. Si bien *M. fortuitum* es manitol negativo a diferencia de *M. peregrinum*, existe según la bibliografía una biovariante de *M. fortuitum* sorbitol negativo que es manitol positivo y de secuencia 16S rARN idéntica a *M. porcinum* (manitol y citrato positivo) (Wallace *et al.*, 2004), considerándose entonces los resultados concordantes.

Tabla 6: Resultados concordantes entre la técnica de PRA y pruebas bioquímicas convencionales en la identificación de 27/56 aislamientos de MA.

NºCEPA	Identificación por PRA	IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA
5	<i>M.neoaurum</i> tipo 1/ <i>M.parafortuitum</i> tipo 2	<i>M. neoaurum</i>
24	<i>M. duvalii</i> tipo 1	<i>M.duvalii</i>
28	<i>M. poriferae</i> tipo 1	<i>M.poriferae</i>
29A	<i>M.vaccae</i> tipo1	<i>M.vaccae</i>
30	<i>M.vaccae</i> tipo1	<i>M.vaccae</i>
34	<i>M.gordonae</i> tipo 9	<i>M.gordonae</i>
44A	<i>M.gordonae</i> tipo 3	<i>M.gordonae</i>
44B	<i>M.gordonae</i> tipo 9	<i>M.gordonae</i>

N°CEPA	Identificación por PRA	IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA
47A	<i>M.flavescens</i> tipo3/ <i>M. vaccae</i>	<i>M.vaccae</i>
47B	<i>M.flavescens</i> tipo3/ <i>M. vaccae</i>	<i>M.vaccae</i>
48B	<i>M.vaccae</i> tipo1	<i>M.vaccae</i>
52B	<i>M.vaccae</i> tipo1/ <i>M.aurum</i> tipo 2	<i>M.aurum</i>
53B	<i>M.aurum</i> tipo 2	<i>M.aurum</i>
54	<i>M.gordonae</i> tipo 2	<i>M.gordonae</i>
71	<i>M.porcinum</i> tipo 1/ <i>M. peregrinum</i> tipo2/ <i>M. septicum</i> tipo1	<i>M.porcinum</i>
74	<i>M.porcinum</i> tipo 1 / <i>M. peregrinum</i> tipo 2/ <i>M. septicum</i> tipo1	<i>M.fortuitum</i> / <i>M.peregrinum</i>
77A	<i>M.vaccae</i> tipo1/ <i>M.aurum</i> tipo 2	<i>M.aurum</i>
77D	<i>M.vaccae</i> tipo1/ <i>M.aurum</i> tipo 2	<i>M.aurum</i>
78E	<i>M. arupense</i> tipo 1	<i>M.arupense</i>
78F	<i>M. arupense</i> tipo 1	<i>M.arupense</i>
79B	<i>M.porcinum</i> tipo1/ <i>M.peregrinum</i> tipo 2/ <i>M.septicum</i> tipo 1	<i>M.fortuitum</i> / <i>M. peregrinum</i>
80D	<i>M. gordonae</i> tipo 4	<i>M. gordonae</i>
83A	<i>M.aurum</i> tipo 2	<i>M.aurum</i>
87A	<i>M. peregrinum</i> tipo 1	<i>M. fortuitum</i> / <i>M.peregrinum</i>
88D	<i>M.asiaticum</i> tipo 1	<i>M.asiaticum</i>
89A	<i>M.peregrinum</i> tipo 3	<i>M.peregrinum</i>
90B	<i>M.fortuitum</i> tipo 2	<i>M.fortuitum</i>

5.3 Identificación de MA por secuenciación del gen 16S rARN

El criterio para la selección de cepas a secuenciar fue en un principio la no concordancia entre el PRA y la tipificación bioquímica, la presencia de un mismo patrón de restricción para varias posibles especies o valores de “score” elevados según el algoritmo del PRASITE. Posteriormente a la totalidad de los aislamientos se les realizó secuenciación de un fragmento del gen 16S rARN, de acuerdo a la metodología descrita por Kirshner y Böttger (1998), para ser utilizada como técnica de referencia. La secuencia nucleotídica generada se comparó con aquellas disponibles en las bases de datos RIDOM (<http://rdna.ridom.de/>) y de GenBank, utilizando la herramienta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Se pudieron identificar 89,26% (50/56) de las cepas analizadas por este método. La Tabla 7 muestra los resultados de la secuenciación en comparación con los datos obtenidos por PRA y las técnicas convencionales.

Tabla 7: Comparación de datos obtenidos por PRA, secuenciación del gen 16S rARN y pruebas bioquímicas para la identificación a nivel de especie de 56 aislamientos de MA.

N°CEPA	Identificación por PRA	SECUENCIACIÓN 16S rARN (%identidad)	IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA
1	No amplificó ⁺	<i>M.fortuitum</i> (100%)	<i>M.fortuitum</i>
5	<i>M.neoaurum</i> tipo 1/ <i>M.parafortuitum</i> tipo 2	<i>M.fluoranthenvorans</i> (100%)	<i>M.neoaurum</i>
6	<i>M.florentinum</i> tipo 1/ <i>M.lentiflavum</i> tipo 1	<i>M.lentiflavum</i> (99,54%)	<i>Mycobacterium</i> sp.
24	<i>M. duvalii</i> tipo 1	<i>M. duvalii</i> (100%)	<i>M. duvalii</i>
28	<i>M.poriferae</i>	Secuencia de mala calidad	<i>M.poriferae</i>
29A	<i>M.vaccae</i> tipo1	<i>M.vaccae</i> (99%)	<i>M.vaccae</i>
29B	<i>M. komassense</i> / <i>M. parafortuitum</i> tipo 1	<i>M.farcinogenes</i> / <i>M.senegalense</i> / <i>M.mucogenicum</i> (97,9%)	<i>Mycobacterium</i> sp.”
30	<i>M.vaccae</i> tipo1	<i>M.vaccae</i> (99%)	<i>M.vaccae</i>
34	<i>M.gordoniae</i> tipo 9	Secuencia de mala calidad	<i>M.gordoniae</i>
44A	<i>M.gordoniae</i> tipo 3	<i>M.gordoniae</i> (99,75%)	<i>M.gordoniae</i>
44B	<i>M.gordoniae</i> tipo 9	<i>M.gordoniae</i> (100%)	<i>M.gordoniae</i>
47A	<i>M.flavescens</i> tipo3/ <i>M.vaccae</i>	<i>M.vaccae</i> (99%)	<i>M.vaccae</i>
47B	<i>M.flavescens</i> tipo3/ <i>M. vaccae</i>	<i>M. monacense</i> / <i>M.austroafricanum</i> (97,44/96,74%)	<i>M.vaccae</i>
48B	<i>M.vaccae</i>	Secuencia de mala calidad	<i>M.vaccae</i>
48C	<i>M.gilvum</i> tipo1	<i>M.vaccae</i> (100%)	<i>M.vaccae</i>
52B	<i>M.vaccae</i> tipo1/ <i>M.aurum</i> tipo 2	<i>M.aurum</i> (100%)	<i>M.aurum</i>
53A	<i>M.senegalense</i> tipo 2	<i>M. duvalii</i> (100%)	<i>M. duvalii</i>
53B	<i>M.aurum</i> tipo 2	<i>M.aurum</i> (100%)	<i>M.aurum</i>
54	<i>M.gordoniae</i> tipo 2	<i>M.gordoniae</i> (100%)	<i>M.gordoniae</i>
69	<i>M.fortuitum</i> tipo 2	<i>M.nonchromogenicum</i> (98,49%)	<i>M.nonchromogenicum</i>
71	<i>M.porcinum</i> tipo 1/ <i>M. peregrinum</i> tipo2/ <i>M. septicum</i> tipo1	<i>M.porcinum</i> / <i>M. fortuitum</i> (99,77%)	<i>M.porcinum</i> / <i>M.fortuitum</i>
73	<i>M.fortuitum</i> tipo 2	<i>M. nonchromogenicum</i> (98,26%)	<i>M.nonchromogenicum</i>
74	<i>M.porcinum</i> tipo 1 / <i>M. peregrinum</i> tipo 2/ <i>M. septicum</i> tipo1	<i>M.fortuitum</i> / <i>porcinum</i> (99,77%)	<i>M.fortuitum</i> o <i>M.peregrinum</i>
75	<i>M.brumae</i> tipo1	<i>M.moriokaense</i> (99,77%)	<i>Mycobacterium</i> sp.
76	<i>M.fortuitum</i> tipo 2	<i>M.nonchromogenicum</i> (98,17%)	<i>Mycobacterium</i> sp.
77A	<i>M.vaccae</i> tipo1/ <i>M.aurum</i> tipo 2	<i>M.aurum</i> (100%)	<i>M.aurum</i>
77B	<i>M. parafortuitum</i> tipo 1/ <i>M.komossense</i> tipo1	<i>M. duvalii</i> (99,66%) <i>M.vaccae</i> (99%)	<i>Mycobacterium</i> sp. *
77C	<i>M.parafortuitum</i> tipo 1/ <i>M.Komossense</i> tipo1	<i>M. duvalii</i> (98,84%) <i>M.vaccae</i> (99%)	<i>Mycobacterium</i> sp. *
77D	<i>M.vaccae</i> tipo1/ <i>M.aurum</i> tipo2	Secuencia de mala calidad	<i>M.aurum</i>

N°CEPA	Identificación por PRA	SECUENCIACIÓN 16S rARN (%identidad)	IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA
78A	<i>M.parafortuitum</i> tipo 1/ <i>M.komossense</i> tipo1	<i>M. duvalii</i> (98,57%) <i>M. vaccae</i> (91%)	<i>Mycobacterium</i> sp. *
78B	<i>M. simiae</i> tipo 2	<i>M. monacense</i> / <i>M. acapulcensis</i> (96,7%)	<i>Mycobacterium</i> sp.
78C	<i>M. gilvun</i> tipo 1	<i>M. duvalii</i> (100%)	<i>Mycobacterium</i> sp.
78E	<i>M. arupense</i> tipo 1	<i>M. arupense</i> 98%/ <i>M. nonchromogenicum</i> (97,92%)	<i>M. arupense</i>
78F	<i>M. arupense</i> tipo 1	<i>M. terrae</i> (baja identidad)(64%)	<i>M. arupense</i>
78G	<i>M. simiae</i> tipo2	<i>M. monacense</i> / <i>M. acapulcensis</i> (96,74%)	<i>Mycobacterium</i> sp.
79A	<i>M. novocastrense</i> tipo1	<i>M. vaccae</i> / <i>Maustroafricanum</i> (98,84%)	<i>M. vaccae</i>
79B	<i>M. porcinum</i> tipo1/ <i>M. peregrinum</i> tipo 2/ <i>M. septicum</i> tipo 1	<i>M. fortuitum</i> (99,7%)	<i>M. fortuitum</i> o <i>M. peregrinum</i>
80A	<i>M. lentiflavum</i> / <i>M. florentinum</i> / <i>M. simiae</i> tipo 5	<i>M. intracellulare</i> (99%)	<i>Mycobacterium</i> sp.
80B	<i>M. novocastrense</i> tipo 1	<i>M. vaccae</i> (100%)/ <i>M. austroafricanum</i> (98,84%)	<i>M. vaccae</i>
80C	<i>M. parafortuitum</i> tipo 1/ <i>M. Komossense</i> tipo 1	<i>M. duvalii</i> (99,72%)	<i>Mycobacterium</i> sp.
80D	<i>M. gordonae</i> tipo 4	Secuencia de mala calidad	<i>M. gordonae</i>
83A	<i>M. aurum</i> tipo 2	<i>M. aurum</i> (100%)	<i>M. aurum</i>
83C	<i>M. parafortuitum</i> tipo1/ <i>M. komossense</i> tipo1	<i>M. farcinogenes</i> / <i>M. senegalense</i> / <i>M. mucogenicum</i> (97,9%)	<i>Mycobacterium</i> sp. "
83D	<i>M. parafortuitum</i> tipo1/ <i>M. komossense</i> tipo1	<i>M. farcinogenes</i> / <i>M. senegalense</i> / <i>M. mucogenicum</i> (97,9%)	<i>Mycobacterium</i> sp. "
86	<i>M. parafortuitum</i> tipo1/ <i>M. komossense</i> tipo1	<i>M. farcinogenes</i> / <i>M.</i> <i>senegalense</i> / <i>M. mucogenicum</i> (97,9%)	<i>Mycobacterium</i> sp. "
87A	<i>M. peregrinum</i> tipo 1	<i>M. peregrinum</i> / <i>M. septicum</i> (100%)	<i>M. peregrinum</i>
87B	<i>M. confluentis</i> tipo1	<i>M. parafortuitum</i> (96,73%)	<i>M. parafortuitum</i>
88A	<i>M. moriokaense</i> tipo 1	<i>M. aurum</i> (98,6%)	<i>M. aurum</i>
88B	<i>M. kumamotoense</i> tipo 1	<i>M. arupense</i> (97%)	<i>M. arupense</i>
88C	<i>M. kumamotoense</i> tipo 1	<i>M. arupense</i> (100%)	<i>M. arupense</i>
88D	<i>M. asiaticum</i> tipo 1	<i>M. asiaticum</i> (98,87%)	<i>M. asiaticum</i>
89A	<i>M. peregrinum</i> tipo 3	<i>M. peregrinum</i> / <i>M. septicum</i> (100%)	<i>M. peregrinum</i>
89B	<i>M. parascrofulaceum</i> tipo 3	<i>M. austroafricanum</i> (98,14%)	<i>M. chlorophenicum</i>
89C	<i>M. parascrofulaceum</i> tipo 3	<i>M. austroafricanum</i> (98,14%)	<i>M. chlorophenicum</i>
90A	<i>M. bohemicum</i> tipo1	<i>M. gordonae</i> (99,5%)	<i>M. gordonae</i>
90B	<i>M. fortuitum</i> tipo 2	<i>M. fortuitum</i> (99,07%)	<i>M. fortuitum</i>

*No amplificó en concentraciones suficientes para ser digerido por las enzimas de restricción (*y “) especies que comparten pruebas bioquímicas idénticas.

Si se comparan los resultados obtenidos por el método PRA con la secuenciación del fragmento del gen 16S rARN, el PRA se correspondió en su identidad con el 35,71% de las cepas. Si se utilizan las pruebas bioquímicas como método de validación de los datos observados, el 55,36% de las mismas concordaron con los resultados obtenidos por secuenciación. En la tabla 8 se muestran los datos concordantes entre los tres métodos.

Tabla 8: Resultados concordantes entre los métodos utilizados, técnica de PRA, secuenciación de un fragmento del gen 16S rARN e identificación bioquímica, de 21/56 aislamientos de MA.

N°CEPA	Identificación por PRA	SECUENCIACIÓN 16S rARN (% identidad)	IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA
1	No amplificó ^a	<i>M.fortuitum</i> (100%)	<i>M.fortuitum</i>
6	<i>M.florentinum</i> tipo 1/ <i>M. lentiflavum</i> tipo 1	<i>M.lentiflavum</i> (99,54%)	<i>Mycobacterium</i> sp ^b .
24	<i>M. duvalii</i> tipo 1	<i>M.duvalii</i> (100%)	<i>M.duvalii</i>
29A	<i>M.vaccae</i> tipo1	<i>M.vaccae</i> (99%)	<i>M.vaccae</i>
30	<i>M.vaccae</i> tipo 1	<i>M. vaccae</i> (99%)	<i>M.vaccae</i>
44A	<i>M.gordoniae</i> tipo 3	<i>M.gordoniae</i> (99,75%)	<i>M. gordoniae</i>
44B	<i>M.gordoniae</i> tipo 9	<i>M.gordoniae</i> (100%)	<i>M. gordoniae</i>
47A	<i>M.flavescens</i> tipo3/ <i>M.vaccae</i>	<i>M.vaccae</i> (99%)	<i>M.vaccae</i>
52B	<i>M.vaccae</i> tipo1/ <i>M.aurum</i> tipo 2	<i>M.aurum</i> (100%)	<i>M.aurum</i>
53B	<i>M.aurum</i> tipo 2	<i>M.aurum</i> (100%)	<i>M.aurum</i>
54	<i>M.gordoniae</i> tipo2	<i>M.gordoniae</i> (100%)	<i>M.gordoniae</i>
71	<i>M.porcinum</i> tipo 1/ <i>M. peregrinum</i> tipo2/ <i>M. septicum</i> tipo1	<i>M.porcinum/fortuitum</i> (99,77%)	<i>M.porcinum/ M.fortuitum</i>
74	<i>M.porcinum</i> tipo 1 / <i>M. peregrinum</i> tipo 2/ <i>M. septicum</i> tipo1	<i>M.fortuitum/porcinum</i> (99,77%)	<i>M.fortuitum o M.peregrinum</i>
77A	<i>M.vaccae</i> tipo1/ <i>M.aurum</i> tipo2	(<i>M.aurum</i> 100%)	<i>M.aurum</i>
78E	<i>M.arupense</i> tipo1	<i>M.arupense</i> 98%/ <i>M.nonchromogenicum</i> (97,92%)	<i>M.arupense</i>
79B	<i>M.porcinum</i> tipo1/ <i>M.peregrinum</i> tipo 2/ <i>M.septicum</i> tipo 1	<i>M.fortuitum</i> (99,7%)	<i>M.fortuitum o M.peregrinum</i>
83A	<i>M.aurum</i> tipo 2	<i>M.aurum</i> (100%)	<i>M.aurum</i>
87A	<i>M.peregrinum</i> tipo 1	<i>M.peregrinum/ M.septicum</i> (100%)	<i>M.peregrinum</i>
88D	<i>M.asiaticum</i> tipo 1	<i>M.asiaticum</i> (98,87%)	<i>M.asiaticum</i>
89A	<i>M.peregrinum</i> tipo 3	<i>M.peregrinum/ M,septicum</i> (100%)	<i>M.peregrinum</i>
90B	<i>M.fortuitum</i> tipo 2	<i>M.fortuitum</i> (99,07%)	<i>M.fortuitum</i>

^a No se obtuvo una amplificación de concentración suficiente para que pudiera ser digerida con las enzimas de restricción y observados los patrones.

^b la tipificación bioquímica de la cepa 6 no concordó con ninguna de las dos técnicas moleculares utilizadas

5.4 Identificación de MA por secuenciación del gen *hsp65*

La secuenciación del gen *hsp65*, también utilizada para la identificación de las diferentes especies de micobacterias (Ringuet *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2005), se empleó como una herramienta complementaria para estudiar los resultados discordantes. Se encontró una concordancia entre este método y el PRA del 50%. Ambas técnicas, si bien se basan en el análisis del mismo gen, son metodológicamente diferentes. La no total concordancia entre los datos obtenidos con uno u otro método podría indicar la presencia de gran variabilidad entre las cepas de MA. Además hay que considerar que la información de las bases de datos de secuencias no siempre es completa y actualizada.

Asimismo, al comparar los resultados de las pruebas bioquímicas, éstos se correspondieron en un 60,71% con los logrados por secuenciación del gen *hsp65*.

Es de destacar nuevamente la repetitividad de los resultados entre las cepas 80B y 79A, 77B, 77C, 78A y 80C, recuperadas de diferentes muestras de un mismo origen (laguna RRU). También en el caso de los aislamientos de la laguna La Arocena, 29B, 83C, 83D y 86, de iguales patrones de PRA, secuencia *hsp65* y pruebas fenotípicas, aunque no se lograron identificar ni por secuenciación del gen *hsp65* ni bioquímicamente, si bien se pudo constatar que corresponden al género *Mycobacterium*. En la tabla 9 se detallan los datos obtenidos por la técnica de PRA, secuenciación de *hsp65* y pruebas bioquímicas.

Tabla 9: Comparación de los resultados obtenidos por la técnica del PRA y secuenciación del gen *hsp65*, acompañado por la identificación bioquímica, en la tipificación de 56 aislamientos de MA. Remarcados en negrita los datos no concordantes entre PRA y secuenciación del gen *hsp65*.

N°CEPA	Identificación por PRA	SECUENCIACIÓN gen <i>hsp65</i> (BLAST) (% identidad)	IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA
1	No amplificó	Secuencia de mala calidad	<i>M.fortuitum</i>
5	<i>M.neoaurum</i> tipo 1/ <i>M.parafortuitum</i> tipo 2	<i>M.lacticola</i> / <i>M.neoaurum</i> (96%)	<i>M.neoaurum</i>
6	<i>M.florentinum</i> tipo 1/ <i>M.lentiflavum</i> tipo 1	<i>M.lentiflavum</i> (99%)	<i>Mycobacterium</i> sp.
24	<i>M.duvallii</i> tipo 1	<i>M.duvallii</i> (99%)	<i>M.duvallii</i>
28	<i>M.poriferae</i> tipo 1	<i>M.poriferae</i> (95%)	<i>M.poriferae</i>
29A	<i>M.vaccae</i> tipo1	Secuencia de mala calidad	<i>M.vaccae</i>
29B	<i>M.komassense</i> / <i>parafortuitum</i> tipo 1	Secuencia de mala calidad	<i>Mycobacterium</i> sp.
30	<i>M.vaccae</i> tipo1	<i>M.aurum</i> (96%)	<i>M.vaccae</i>

N°CEPA	Identificación por PRA	SECUENCIACIÓN gen <i>hsp65</i> (BLAST) (% identidad)	IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA
34	<i>M.gordonae</i> tipo 9	<i>M.gordonae</i> (100%)	<i>M.gordonae</i>
44A	<i>M.gordonae</i> tipo 3	<i>M.gordonae</i> (98%)	<i>M.gordonae</i>
44B	<i>M.gordonae</i> tipo 9	Secuencia de mala calidad	<i>M.gordonae</i>
47A	<i>M.flavescens</i> tipo3/ <i>M.vaccae</i>	<i>M.aurum</i> / <i>M.flavescens</i> ; <i>M. vaccae</i> (96/94%)	<i>M.vaccae</i>
47B	<i>M.flavescens</i> tipo3/ <i>M. vaccae</i>	<i>M.aurum</i> / <i>M. flavescens</i> ; <i>M.vaccae</i> (96/94%)	<i>M.vaccae</i>
48B	<i>M.vaccae</i> tipo1	<i>M.gilvum</i> / <i>M.vaccae</i> (96/93%)	<i>M.vaccae</i>
48C	<i>M.gilvum</i>	Secuencia de mala calidad	<i>M.vaccae</i>
52B	<i>M.vaccae</i> tipo1/ <i>M.aurum</i> tipo 2	<i>M.aurum</i> (96%)	<i>M.aurum</i>
53A	<i>M.senegalense</i> tipo 2	<i>M.duvallii</i> (99%)	<i>M.duvallii</i>
53B	<i>M.aurum</i> tipo 2	Secuencia de mala calidad	<i>M.aurum</i>
54	<i>M.gordonae</i> tipo 2	<i>M.gordonae</i> (100%)	<i>M.gordonae</i>
69	<i>M.fortuitum</i> tipo 2	<i>M. terrae</i>/<i>M. nonchromogenicum</i> (99/97%)	<i>M.nonchromogenicum</i>
71	<i>M.porcinum</i> tipo 1/ <i>M. peregrinum</i> tipo2/ <i>M. septicum</i> tipo1	<i>M. brisbanense</i> / <i>M. peregrinum</i> / <i>M. septicum</i> / <i>M. porcinum</i> / <i>M. fortuitum</i> (98%)	<i>M.porcinum</i> / <i>M.fortuitum</i>
73	<i>M.fortuitum</i> tipo 2	<i>M.terrae</i>/ <i>M.nonchromogenicum</i> (99/97%)	<i>M.nonchromogenicum</i>
74	<i>M.porcinum</i> tipo 1 / <i>M. peregrinum</i> tipo2/ <i>M. septicum</i> tipo1	<i>M. brisbanense</i> / <i>M. peregrinum</i> (98%)	<i>M.fortuitum</i> o <i>M.peregrinum</i>
75	<i>M.brumae</i> tipo1	<i>M. moriokaense</i> (97%)	<i>Mycobacterium</i> sp.
76	<i>M.fortuitum</i> tipo 2	<i>M.terrae</i>/<i>M.nonchromogenicum</i> (99/97%)	<i>Mycobacterium</i> sp.
77A	<i>M.vaccae</i> tipo1/ <i>M.aurum</i> tipo2	<i>M.aurum</i> / <i>M.Komossense</i> / <i>M.vaccae</i> (97/94%)	<i>M. aurum</i>
77B	<i>M. parafortuitum</i> tipo 1/ <i>M. komossense</i> tipo1	<i>M.vaccae</i> / <i>M.parafortuitum</i> / <i>M.komossense</i> (96/95%)	<i>Mycobacterium</i> sp.*
77C	<i>M.parafortuitum</i> tipo 1/ <i>M. Komossense</i> tipo1	<i>M.komossense</i> / <i>M. vaccae</i> / <i>M.novocastense</i> (96%)	<i>Mycobacterium</i> sp.*
77D	<i>M.vaccae</i> tipo1/<i>M.aurum</i> tipo 2	No dio la secuencia	<i>M.aurum</i>
78A	<i>M.parafortuitum</i> tipo 1/ <i>M.komossense</i> tipo1	<i>M.komossense</i> / <i>M.vaccae</i> / <i>M.novocastense</i> (96%)	<i>Mycobacterium</i> sp.*
78B	<i>M.simiae</i> tipo2	<i>M.austroafricanum</i> (96%)	<i>Mycobacterium</i> sp.
78C	<i>M.gilvum</i> tipo1	<i>M.duvallii</i> (99%)	<i>Mycobacterium</i> sp.
78E	<i>M. arupense</i> tipo 1	<i>M.arupense</i> (100%)	<i>M.arupense</i>
78F	<i>M. arupense</i> tipo 1	<i>M.arupense</i> (99%)	<i>M.arupense</i>
78G	<i>M.simiae</i> tipo2	<i>M.austroafricanum</i> (96%)	<i>Mycobacterium</i> sp.
79A	<i>M. novocastrense</i> tipo1	<i>M.vaccae</i> (93%)	<i>M.vaccae</i>
79B	<i>M.porcinum</i> tipo1/ <i>M.peregrinum</i> tipo 2/ <i>M.septicum</i> tipo 1	<i>M.peregrinum</i> / <i>M. porcinum</i> / <i>M.septicum</i> (98%)	<i>M.fortuitum</i> o <i>M.peregrinum</i>
80A	<i>M.lentiflavum</i> / <i>M. florentinum</i> / <i>M.simiae</i> tipo 5	<i>M.lentiflavum</i> (97%)	<i>Mycobacterium</i> sp.
80B	<i>M.novocastrense</i> tipo 1	<i>M.vaccae</i> (93%)	<i>M.vaccae</i>
80C	<i>M.parafortuitum</i> tipo 1/ <i>M.komossense</i> tipo1	<i>M.komossense</i> / <i>M. vaccae</i> / <i>M.novocastense</i> (96%)	<i>Mycobacterium</i> sp.*
80D	<i>M. gordonae</i> tipo 4	<i>M.gordonae</i> (96%)	<i>M. gordonae</i>

(continuación Tabla 9)

N°CEPA	Identificación por PRA	SECUENCIACIÓN gen <i>hsp65</i> (BLAST) (% identidad)	IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA
83A	<i>M.aurum</i> tipo 2	<i>M.aurum</i> (99%)	<i>M.aurum</i>
83C	<i>M.parafortuitum</i> tipo1/ <i>M.komossense</i> tipo1	<i>Mycobacterium</i> sp. (98%)	<i>Mycobacterium</i> sp."
83D	<i>M.parafortuitum</i> tipo1/ <i>M.komossense</i> tipo1	<i>Mycobacterium</i> sp. (98%)	<i>Mycobacterium</i> sp."
86	<i>M.parafortuitum</i> tipo1/ <i>M.komossense</i> tipo1	<i>Mycobacterium</i> sp.(97%)	<i>Mycobacterium</i> sp."
87A	<i>M. peregrinum</i> tipo 1	<i>M.peregrinum</i> / <i>M. porcinum</i> / <i>M.septicum</i> (99%)	<i>M.peregrinum</i>
87B	<i>M.confluentis</i> tipo1	<i>M.iranicum</i> / <i>M. parafortuitum</i> (97/95%)	<i>M.parafortuitum</i>
88A	<i>M.moriokaense</i> 1	Secuencia de mala calidad	<i>M.aurum</i>
88B	<i>M.kumamotonense</i> tipo 1	<i>M.arupense</i> (100%)	<i>M.arupense</i>
88C	<i>M.kumamotonense</i> tipo 1	<i>M.arupense</i> (99%)	<i>M.arupense</i>
88D	<i>M.asiaticum</i> tipo 1	<i>M.asiaticum</i> (95%)	<i>M.asiaticum</i>
89A	<i>M.peregrinum</i> tipo 3	<i>M.peregrinum</i> (99%)	<i>M.peregrinum</i>
89B	<i>M.parascrofulaceum</i> tipo 3	<i>M.rutilum</i> / <i>M. chubuense</i> / <i>M.novocastrense</i> (96%)	<i>M. chlorophenicum</i>
89C	<i>M. parascrofulaseum</i> tipo 3	<i>M.rutilum</i> / <i>M.chubuense</i> / <i>M.novocastrense</i> (96%)	<i>M. chlorophenicum</i>
90A	<i>M.bohemicum</i> tipo1	<i>M.gordonae</i> (98%)	<i>M.gordonae</i>
90B	<i>M.fortuitum</i> tipo 2	<i>M.setense</i> / <i>fortuitum</i> (99/98%)	<i>M.fortuitum</i>

(*y “) especies que comparten pruebas bioquímicas idénticas.

Al confrontar los resultados obtenidos por secuenciación de un fragmento del 16S rARN y secuenciación del gen *hsp65* la concordancia es del 48,21%. Los datos se muestran en la tabla 10.

Tabla 10: Concordancia entre la secuenciación de un fragmento del gen 16S rARN y secuenciación del gen *hsp65* e identificación por pruebas bioquímicas correspondiente, de 27/56 aislamientos de MA.

N°CEPA	SECUENCIACIÓN 16S rARN	SECUENCIACIÓN gen <i>hsp65</i> (BLAST)	IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA
6	<i>M.lentiflavum</i> (99,54%)	<i>M. lentiflavum</i> (99%)	<i>Mycobacterium</i> sp.
24	<i>M.duvalii</i> (100%)	<i>M.duvalii</i> (99%)	<i>M.duvalii</i>
44A	<i>M.gordonae</i> (99,75%)	<i>M.gordonae</i> (98%)	<i>M.gordonae</i>
47A	<i>M.vaccae</i> (99%) <i>M.monacense</i> (97,36%)	<i>M.aurum</i> / <i>M.flavescens</i> ; <i>M. vaccae</i> (96/94%)	<i>M.vaccae</i>
52B	<i>M.aurum</i> (100%)	<i>M.aurum</i> (96%)	<i>M.aurum</i>
53A	<i>M.duvalii</i> (100%)	<i>M.duvalii</i> (99%)	<i>M.duvalii</i>
54	<i>M.gordonae</i> (100%)	<i>M.gordonae</i> (100%)	<i>M.gordonae</i>
69	<i>M.nonchromogenicum</i> (98,49%)	<i>M. terrae</i> / <i>M. nonchromogenicum</i> (99/97%)	<i>M.nonchromogenicum</i>

(continuación Tabla 10)

N°CEPA	SECUENCIACIÓN 16S rARN	SECUENCIACIÓN gen <i>hsp65</i> (BLAST)	IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA
71	<i>M.porcinum/fortuitum</i> (99,77%)	<i>M. brisbanense/M. peregrinum/M. septicum/M. porcinum/M. fortuitum</i> (98%)	<i>M.porcinum/M.fortuitum</i>
73	<i>M. nonchromogenicum</i> (98,26%)	<i>M.terrae/M.nonchromogenicum</i> (99/97%)	<i>M.nonchromogenicum</i>
75	<i>M.moriokaense</i> (99,77%)	<i>M. moriokaense</i> (97%)	<i>Mycobacterium sp.</i>
76	<i>M.nonchromogenicum</i> (98,17%)	<i>M.terrae/M.nonchromogenicum</i> (99/97%)	<i>Mycobacterium sp.</i>
77A	<i>M.aurum</i> (100%)	<i>M.aurum/M. Komossense /M. vaccae</i> (97/94%)	<i>M.aurum</i>
78C	<i>M.duvalii</i> (100%)	<i>M.duvalii</i> (99%)	<i>Mycobacterium sp.</i>
78E	<i>M.arupense</i> (98%)/ <i>M.nonchromogenicum</i> (97,92%)	<i>M. arupense</i> (100%)	<i>M.arupense</i>
79A	<i>M.vaccae/ Maustroafricanum</i> (98,84%)	<i>M.vaccae</i> (93%)	<i>M.vaccae</i>
79B	<i>M.fortuitum</i> (99,7%)	<i>M.peregrinum/porcinum/septicum</i> (98%)	<i>M.fortuitum o M.peregrinum*</i>
80B	<i>M.vaccae</i> (100%)	<i>M.vaccae</i> (93%)	<i>M.vaccae</i>
83A	<i>M.aurum</i> (100%)	<i>M.aurum</i> (99%)	<i>M.aurum</i>
87A	<i>M.peregrinum/M.septicum</i> (100%)	<i>M.peregrinum/M. porcinum/M. septicum</i> (99%)	<i>M.peregrinum</i>
87B	<i>M.parafortuitum</i> (96,73%)	<i>M.iranicum/M. parafortuitum</i> (97/95%)	<i>M.parafortuitum</i>
88B	<i>M.arupense</i> (97%)	<i>M.arupense</i> (100%)	<i>M.arupense</i>
88C	<i>M.arupense</i> (100%)	<i>M.arupense</i> (99%)	<i>M.arupense</i>
88D	<i>M.asiaticum</i> (98,87%)	<i>M.asiaticum</i> (95%)	<i>M.asiaticum</i>
89A	<i>M.peregrinum/M.septicum</i> (100%)	<i>M.peregrinum</i> (99%)	<i>M.peregrinum</i>
90A	<i>M.gordonae</i> (99,5%)	<i>M.gordonae</i> (98%)	<i>M.gordonae</i>
90B	<i>M.fortuitum</i> (99,07%)	<i>M.setense/M.fortuitum</i> (99/98%)	<i>M.fortuitum</i>

**M.fortuitum* 3° biovariante similares pruebas bioquímicas que *M. peregrinum*

Las tablas 11 y 12 resumen el porcentaje de concordancia entre las distintas técnicas empleadas en la identificación de MA. Al comparar la técnica de PRA con las otras técnicas moleculares que se utilizaron observamos una mayor concordancia con la secuenciación del gen *hsp65*. Al analizar los datos obtenidos por pruebas bioquímicas con los datos moleculares hay una mayor concordancia con los métodos de secuenciación que con la técnica de PRA.

Tabla 10: Porcentaje de concordancia entre la técnica de PRA y otros métodos moleculares

Método	PRA
Secuenciación 16S rARN	35,71% (20/56) ^a
Secuenciación <i>hsp65</i>	50,00% (28/56)

^a (N°coincidentes/N°totales)

Tabla 11: Porcentaje de concordancia entre pruebas bioquímicas y métodos moleculares

Método	Pruebas bioquímicas
PRA	48,21% (27/56) ^a
Secuenciación 16S rARN	55,36% (31/56)
Secuenciación <i>hsp65</i>	60,71% (34/56)

^a (N°coincidentes/N°totales)

5.5 Posibles nuevas variantes alélicas expresadas en nuevos patrones PRA

Al utilizar distintas técnicas moleculares para la tipificación de MA, se pudo observar la presencia patrones de restricción no descriptos en el PRASITE que podrían pertenecer a nuevas variantes alélicas dentro del gen *hsp65*. En la tabla 13 se muestran los nuevos patrones PRA obtenidos para las correspondientes especies identificadas por secuenciación y pruebas bioquímicas.

Tabla 13: Especies de MA con posibles variantes alélicas expresadas en nuevos patrones PRA. (Entre paréntesis el nuevo patrón determinado)

N°CEPA	Identificación por PRA				Especie con nuevo patrón	Identificación por secuenciación 16S rARN	Identificación por secuenciación <i>hsp65</i>	Identificación por Pruebas bioquímicas
	PATRONES OBTENIDOS		PATRONES PUBLICADOS					
	BstE II	Hae III	BstE II	Hae III				
48C	440	(188/140)*	440	160/90/60	<i>M.vaccae</i>	<i>M.vaccae</i>	No dio la secuencia	<i>M.vaccae</i>
53A	(245/215)	132/127/60	440	135 / 130 / 65	<i>M.duvallii</i>	<i>M.duvallii</i>	<i>M.duvallii</i>	<i>M.duvallii</i>
69	244/112/95	(136/120/57)	235/120/85	145/60/55	<i>M.nonchromogenicum</i>	<i>M.nonchromogenicum</i>	<i>M.terrae/M.nonchromogenicum</i>	<i>M.nonchromogenicum</i>
73	244/115/96	(136/120/60)	235/120/85	145/60/55	<i>M.nonchromogenicum</i>	<i>M.nonchromogenicum</i>	<i>M.terrae/M.nonchromogenicum</i>	<i>M.nonchromogenicum</i>
75	440	(137/72/55)	235/210	200/90/60	<i>M.moriokaense</i>	<i>M.moriokaense</i>	<i>M.moriokaense</i>	<i>Mycobacterium sp.</i>
78B	245/215	(160/132)	235/210	160/60/50	<i>M.austroafricanum</i>	<i>M.monacense/M.acapulcensis</i>	<i>M.austroafricanum</i>	<i>Mycobacterium sp.</i>
78G	244/213	(166/134)	235/210	160/60/50	<i>M.austroafricanum</i>	<i>M.monacense/M.acapulcensis</i>	<i>M.austroafricanum</i>	<i>Mycobacterium sp.</i>
79A	440	(160/56)	440	160/90/60	<i>M.vaccae tipo1</i>	<i>M.vaccae/M.austroafricanum</i>	<i>M.vaccae</i>	<i>M.vaccae</i>
80B	440	(158/56)	440	160/90/60	<i>M.vaccae tipo1</i>	<i>M.vaccae</i>	<i>M.vaccae</i>	<i>M.vaccae</i>
87B	440	(197/82/55)	440	145/90/60	<i>M.parafortuitum tipo 1</i>	<i>M.vaccae</i>	<i>M.vaccae</i>	<i>M.vaccae</i>
88B	355/113	(145/108/75/56)	320/115	145/75/60	<i>M.parafortuitum tipo 1</i>	<i>M.parafortuitum</i>	<i>M.iranicum/Mparafortuitum</i>	<i>M.parafortuitum</i>
88C	349/112	(146/108/73/54)	320/115	145/75/60	<i>M.arupense</i>	<i>M.arupense</i>	<i>M.arupense</i>	<i>M.arupense</i>
					<i>M.arupense</i>	<i>M.arupense</i>	<i>M.arupense</i>	<i>M.arupense</i>

5.6 Biodiversidad de MA en agua de red, fuentes públicas arquitectónicas de la ciudad de General Pico, La Pampa y en humedales de la zona de influencia.

Las especies más frecuentemente recuperadas a partir de agua de red fueron *M. nonchromogenicum* (28%), *M. fortuitum* (18%) y *M. gordonae* (18%), seguidas de *M. fluoranthenorans/neoaurum* (9%), *M. lentiflavum* (9%), *M. moriokaense* (9%) y *M. porcinum* (9%). (Figura 19).

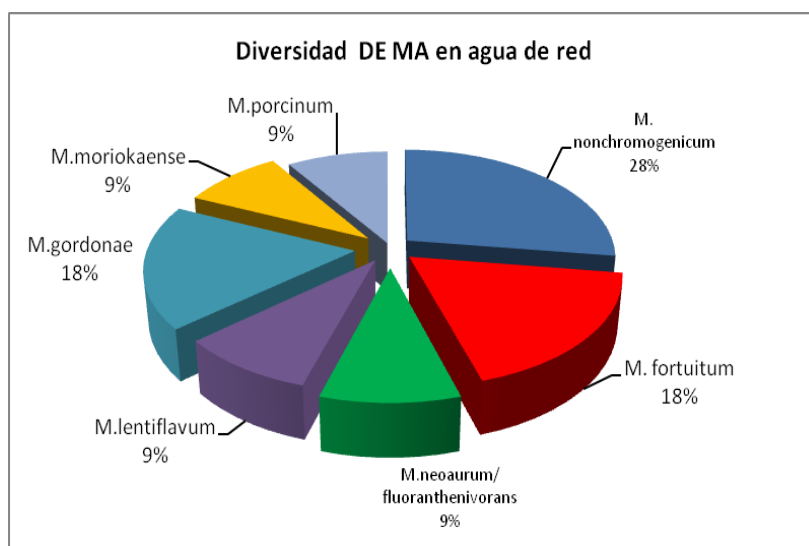


Figura 19: Distribución de especies de MA aisladas a partir de aguas de red de la ciudad de Gral. Pico, La Pampa, desde invierno 2010 a verano 2012.

En la figura 20 se muestra la biodiversidad de MA hallada en las fuentes públicas arquitectónicas, recuperándose *M. peregrinum* (23%), *M. parafortuitum* (11%), *M. aurum* (11%), *M. arupense* (11%), *M. asiaticum* (11%), *M. chlorophenicum* (11%), *M. gordonae* (11%) y *M. fortuitum* (11%).

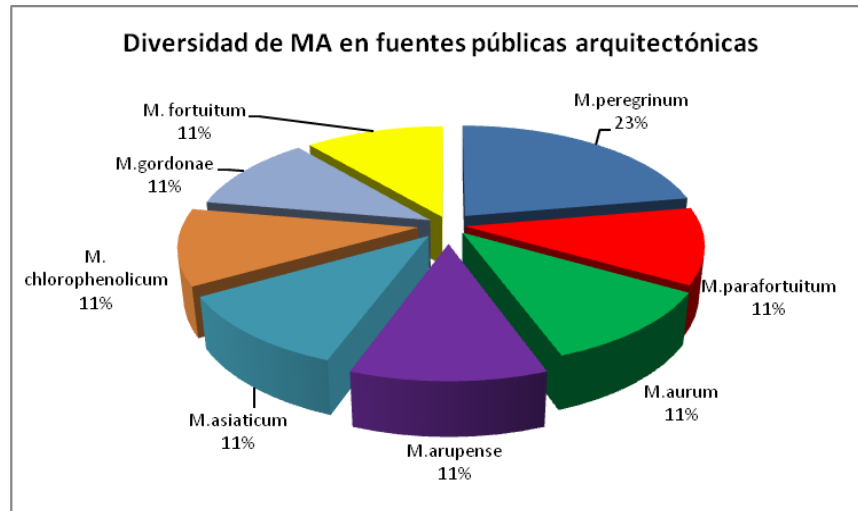


Figura 20: Distribución de especies de MA recuperadas a partir de fuentes públicas arquitectónicas de la ciudad de General Pico, La Pampa, durante el periodo 2010-2012.

En las aguas de humedales se recuperaron en su mayoría especies cromógenas. Los aislamientos fueron identificados como *M. vaccae* (25%), *M. duvalii* (21%), *M. aurum* (18%), *M. gordonae* (10%), *Mycobacterium* sp. (10%), *M. arupense* (4%), *M. monacense/acapulcensis* (4%), *M. poriferae* (4%) y *M. intracellulare* (4%). (Figura 21).

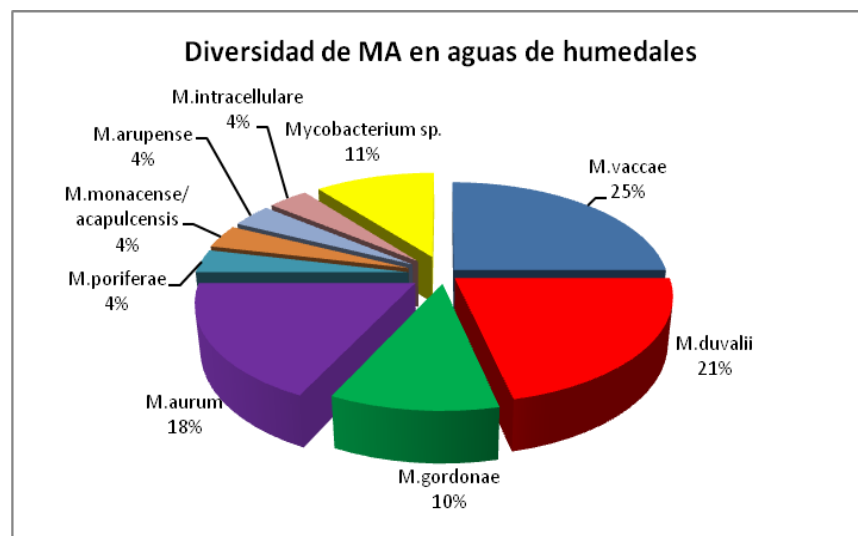


Figura 21: Distribución de especies de MA recuperadas a partir de humedales en a zona de influencia de la ciudad de General Pico, La Pampa, durante el invierno 2010-verano 2012.

6. DISCUSIÓN

Una de las actividades de nuestro laboratorio consiste en la identificación de MA recuperadas a partir de diferentes muestras ambientales y su implicancia en Salud Pública y Sanidad Animal. Para ello, es necesario establecer un esquema de identificación de micobacterias eficaz que se adecue a nuestras características tecnológicas y posibilidades presupuestarias. Por ello este estudio se basa en la comparación de los métodos fenotípicos y moleculares a modo de poder establecer un protocolo de trabajo más conveniente para la identificación de las diferentes especies de MA. En consecuencia el objetivo primordial de este trabajo fue evaluar la utilidad de la técnica del PRA para la tipificación de MA recuperadas de muestras de agua de distintos orígenes, considerada una ruta de transmisión importante de micobacterias. Este método es factible de poder ser implementado en nuestro laboratorio considerando que se requiere de una mediana complejidad.

La diferenciación de las especies del género *Mycobacterium* tradicionalmente se ha realizado mediante el uso de perfiles de pruebas bioquímicas siendo esta una metodología muy laboriosa que requiere como mínimo entre 4 a 8 semanas para poder emitir un resultado (Springer *et al.*, 1996).

Al igual que lo descrito por otros autores (Springer *et al.*, 1996; Tortoli *et al.*, 2001; Esparcia *et al.*, 2011), los esquemas estándar de identificación bioquímica pueden proporcionar resultados tanto ambiguos como erróneos, debido a que algunas de las pruebas que se utilizan no son altamente reproducibles. Por otro lado, el fenotipo de una especie puede exhibir notable variabilidad dependiendo del origen de la muestra ya sea clínica y/o ambiental (Falkinham, 2003). Se debe considerar además que la base de datos disponibles de las características fenotípicas se limita a las especies comunes mientras que en otras especies menos frecuentes no están estandarizadas la totalidad de las determinaciones, haciendo que la precisa identificación a través de este método no sea posible, debido al creciente número de especies de *Mycobacterium* con superposición de características fenotípicas (Springer *et al.*, 1996; da Silva Rocha *et al.*, 2002).

Nosotros observamos algunas variables intrínsecas del cultivo que pueden influenciar en el resultado de la tipificación bioquímica como el tamaño del inóculo (prueba

del nitrato) el tiempo de incubación (pruebas de pirazinamida, catalasa semicuantitativa, reducción del telurito) y la composición del medio de cultivo, principalmente en las especies de lento crecimiento o aquellas muy exigentes nutricionalmente.

Otro claro ejemplo de las limitaciones de la identificación bioquímica se muestra con *M. flavescens*, ya que en la última edición del Manual de Bergey (Withman *et al.*, 2012) se describe sólo los resultados de seis determinaciones, no siendo éstas suficientes para distinguirla entre otras especies posibles tales como *M. komossense*.

Considerando las dificultades ya expresadas de las técnicas convencionales y el aumento en la incidencia de las micobacteriosis durante la última década, se han desarrollado procedimientos de identificación basados en la secuencia de ácidos nucleicos y sistemas disponibles comercialmente tales como AccuProbe System (Gen-Probe, San Diego, CA) e INNO LiPA Micobacterias (Innogenetics NV, Gante, Bélgica) los cuales son métodos relevantes para el diagnóstico de laboratorio, con el inconveniente de caracterizar sólo un número limitado de especies (Miller *et al.*, 2000; Scarparo *et al.*, 2001).

La técnica de PRA es una técnica rápida, fácil de implementar en el laboratorio, de relativo bajo costo, utilizada en el diagnóstico (Devallois *et al.*, 1997; Taylor *et al.*, 1997). Además se ha empleado para estudios taxonómicos (Picardeau *et al.*, 1997) y en la caracterización de nuevos aislamientos (Legrand *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2000). En un principio se desarrolló un algoritmo de identificación de 24 especies de *Mycobacterium* (Taylor *et al.*, 1997) y posteriormente se amplió a 54 (Brunello *et al.*, 2001). En la actualidad se describen 177 patrones diferentes en la base de datos PRASITE.

El método de PRA constituye una valiosa herramienta diagnóstica que puede considerarse como una prueba de orientación y apoyo a la identificación en el laboratorio de micobacterias (Murcia *et al.*, 2004), sin embargo su sensibilidad y especificidad están influenciadas por un gran número de variables. Para contribuir a la validación del PRA un grupo de investigadores, realizó un estudio multicéntrico en ocho laboratorios diferentes, donde se concluyó que si bien el PRA es un método de fácil implementación existen algunos puntos críticos que influyen marcadamente en la robustez de la técnica, tales como la calidad del gel, las condiciones de funcionamiento de la corrida electroforética y la interpretación de los patrones (Leão *et al.*, 2005).

Al comenzar con el análisis de los datos de esta investigación y observar la falta de concordancia entre pruebas fenotípicas y el PRA de 35 aislamientos se recurrió a la secuenciación de un fragmento del gen 16S rARN para su correcta identificación. Es necesario considerar que cuando se practica la técnica del PRA sobre gel de agarosa y la diferenciación entre dos fragmentos de restricción es muy sutil (de 5 a 10 pb) es posible que dichos fragmentos se visualicen como una única banda más ancha en lugar de dos, interfiriendo así en la interpretación de los resultados. Esta problemática se presentó con las cepas 24, 71, 74, 79B y 89A. Dicho error se corrigió al conocer la secuencia del fragmento del gen 16S rARN y volver a interpretar los patrones PRA obtenidos en el gel de agarosa. Por ejemplo, en referencia a la cepa 24, cuando se interpretó el patrón de restricción sobre el gel se observó una de las bandas con un tamaño de 129 pb, identificándose en una primera instancia como *M. novocastrense* o *M. flavescens*, con elevado *score*. Cuando se caracterizó dicha cepa por secuenciación del fragmento 16S rARN, *hsp65* y pruebas bioquímicas, se identificó como *M. duvalii*. Es por ello que pudimos inferir que no se trataba de una única banda sino que en realidad eran dos de 135 y 130 pb, aproximadamente. Esto pondría en evidencia que si bien se utiliza un sistema informático para la determinación del tamaño de las bandas, existe en algunas oportunidades, una valoración subjetiva de las mismas.

Cuando se compararon entre sí los resultados obtenidos entre la técnica del PRA y las pruebas bioquímicas determinamos una concordancia del 48,21%, mientras que en estudios anteriores se había demostrado una concordancia del 74% (Chiamara *et al.*, 2008) y 82% (Godoy *et al.*, 2008), tratándose en ambos casos de cepas aisladas a partir de muestras clínicas.

Por otro lado el PRA resultó ser más preciso cuando lo comparamos con los datos obtenidos por secuenciación del gen *hsp65* (50,00%) mientras que cuando lo contrastamos con la secuenciación del fragmento 16S rARN (35,71%). Sin embargo, otros investigadores obtuvieron mejores resultados ya que identificaron correctamente el 90,3% (Chimara *et al.*, 2008) y 96% (Godoy *et al.*, 2008) de los aislamientos clínicos con el método PRA, en referencia a la secuencia del gen *hsp65*.

En un laboratorio de Brasilia, se analizaron MNT aisladas de 192 pacientes y sólo el 30% de las cepas de MNT se identificaron correctamente mediante la técnica de PRA, en

comparación con la secuenciación del gen *hsp65*, aunque la inclusión sugerida de una enzima de restricción adicional (*Sma*I) aumentó la resolución en aproximadamente el 90% (da Costa *et al.*, 2010).

A su vez en nuestro estudio, las pruebas bioquímicas fueron más precisas que la técnica de PRA, identificando el 55,36% y 60,56% de los aislamientos en correspondencia con la secuencia del 16S rARN y la secuencia *hsp65*, respectivamente. Estos datos difieren a los descritos por otros autores, pues a pesar de que ellos describieron una precisión en las pruebas bioquímicas del 77,9% (Chimara *et al.*, 2008) y 92 % (Godoy *et al.*, 2008), dichos porcentajes fueron relativamente menores que los del PRA.

Estas discrepancias entre nuestros datos y los descritos en la bibliografía podrían explicarse porque en este estudio se incluyeron aislamientos recuperados a partir de muestras ambientales. La presión de selección que ejerce el hábitat sobre las micobacterias podría ser la causa de las diferencias fenotípicas y genotípicas encontradas, lo que llevaría a la prevalencia de cepas capaces de resistir las condiciones ambientales presentes, que a su vez intervienen en la regulación de la expresión génica.

Es de destacar que estudios realizados por da Silva Rocha *et al.* (2002) con un número significativo de aislados clínicos pertenecientes a 16 estados de Brasil, determinaron la presencia de un 10% de variantes alélicas no descritas hasta ese entonces. Los mismos incluyeron nuevos patrones para algunas especies tales como *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare*, *M. flavescens*, *M. fortuitum*, *M. gordonae* y *M. terrae*, mientras que otras cepas no pudieron ser identificadas, demostrando la gran diversidad y la distribución biogeográfica de los genotipos de las micobacterias.

Otros investigadores que estudiaron MA aisladas a partir de aguas naturales y tratadas de un zoológico de San Pablo, encontraron sólo el 19% de los aislamientos con patrones PRA definidos (Brianesi *et al.*, 2012).

Analizando los datos no concordantes entre el PRA y los otros métodos utilizados para la identificación de MA podríamos suponer la existencia de un 21,43% (n=12/56) de variantes alélicas en los aislamientos con nuevos patrones de restricción (Tabla 13). Al tratarse de cepas aisladas del medio ambiente y de lugares geográficos nunca antes estudiados, es muy posible la presencia de especies ya conocidas con nuevos patrones PRA e incluso de nuevas especies.

Existen algunos antecedentes donde la sospecha de cepas con posibles nuevos patrones de PRA resultaron ser en realidad especies del género *Nocardia* (Zumárraga *et al.*, 2012). La técnica de PRA no se utiliza exclusivamente para diferenciar especies de *Mycobacterium* y esta posible interferencia es debido a que tanto la identificación de especies de *Mycobacterium* como de *Nocardia* por PRA utilizan los mismos primers descriptos por Telenti *et al.*, (1993) para la amplificación del gen *hsp65*, con la sola variación de las enzimas de restricción (Steingrube *et al.*, 1995). Si bien este antecedente fue publicado hace varios años, no es mencionado en las publicaciones de PRA de micobacterias (Zumárraga *et al.*, 2012).

Cuando se realizó la secuenciación tanto del gen 16S rARN como el gen *hsp65* se pudo constatar que todos los aislamientos estudiados se correspondieron con el género *Mycobacterium*.

Las anteriores referencias y los resultados de este trabajo sugieren que para identificar cepas aisladas a partir de muestras ambientales la técnica del PRA debe acompañarse por métodos de secuenciación y métodos fenotípicos. De acuerdo con da Silva Rocha *et al.* (2002) las consecuencias de utilizar PRA como procedimiento único de identificación dependerá de cuánto se conoce las frecuencias de los genotipos de MA en la región de interés y se necesitará de un método adicional tanto molecular como fenotípico para cada caso.

Algunos investigadores (Ferdinand *et al.*, 2004; da Costa *et al.*, 2010) concuerdan en que la técnica de PRA no es adecuada para identificar especies nuevas o raramente observadas y es necesario recurrir a la secuenciación del 16S rARN y el análisis de los ácidos micólicos por HPLC para una identificación definitiva.

Es importante remarcar que en todas las técnicas utilizadas en este ensayo, se pudo comprobar la reproducibilidad de resultados cuando se trató de un mismo aislamiento, recuperado a partir de una misma muestra o de distintas muestras de un mismo origen, sugiriendo además la presencia potencial de linajes prevalentes.

Si bien la técnica del PRA no se utiliza para la identificación de especies del complejo *M. tuberculosis*, la misma es capaz de diferenciarlas del resto de las micobacterias. Wong *et al.* (2003) identificaron un total de 2.036 aislamientos clínicos utilizando el PRA en conjunción con otros métodos. Con la técnica de PRA se identificó el

100% de los aislamientos pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* y se describieron resultados altamente consistentes para especies del complejo *M. avium* (MAC) y para la mayoría de los aislamientos de *M. fortuitum*, *M. chelonae* y *M. kansasii*.

El 100% de identidad entre la secuencia del fragmento 16S rARN de la cepa aislada y la secuencia compatible con la especie identificada en las bases de datos, solo se alcanzó en el 28,57% de los aislamientos, lo que nos permite inferir la variabilidad en el gen analizado. Estudios realizados para evaluar la bases de datos RIDOM han demostrado una marcada microheterogenicidad del gen 16S rARN en las especies de micobacterias. Esta variabilidad intraespecífica del gen ha sido reportada independientemente en varias oportunidades, por ello es necesario incluir más de una cepa representativa en una base de datos exhaustiva (Harmsen *et al.*, 2003).

Si se analiza el porcentaje de identidad de nuestras cepas con la secuencia del gen 16S rARN depositada en la base de datos, se pudo observar que la concordancia con el PRA, aún cuando existe un 100% de identidad, es reativamente baja (56,25%). Esto demostraría como ya se discutió anteriormente, la presencia de posibles nuevos patrones PRA aun no descriptos.

La identificación por pruebas bioquímicas mostró un 87,50% de concordancia cuando la identidad en la secuenciación del 16S rARN fue completa. Sin embargo es relevante que la tipificación fenotípica necesitó de la complementaridad de dicha técnica para la correcta identificación.

Otro factor que puede contribuir a la variabilidad intraespecie es la presencia de dos alelos del gen 16S rARN en el genoma de algunas micobacterias, generalmente en las de rápido crecimiento, aunque no es exclusivo de ellas. Asimismo, cuando presentan múltiples copias son generalmente idénticas o muy similares (Turenne *et al.*, 2001).

Debe tenerse en cuenta que la secuenciación del gen 16S rARN es útil para la identificación de todas las especies, excepto para diferenciar entre *M. kansasii* y *M. gastri*, *M. malmoense* y *M. szulgai*, *M. marinum* y *M. ulcerans* y entre *M. abscessus* y *M. chelonae*. En estos casos, es útil la técnica de PRA (Kirschner *et al.*, 1993; Harmsen *et al.*, 2003; Leão *et al.*, 2004). Además, el patrón de dominios conservados y variables dentro de la molécula de rARN ofrece la ventaja única de realizar una sola reacción de amplificación para la

identificación de prácticamente todas las especies de *Mycobacterium* (Kirschner *et al.*, 1993).

En cuanto a la diversidad encontrada de MA en el agua de red, fuentes arquitectónicas de la ciudad de General Pico y en los humedales de la zona de influencia, fue similar a la descrita en la bibliografía (Le Dantec *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2008; Kazda *et al.*, 2009; Brianesi *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2012). Las especies más frecuentemente aisladas en agua de red fueron *M. nonchromogenicum* (n=3), *M. gordonae* (n=2) y *M. fortuitum* (n=2). En referencia a los humedales y fuentes arquitectónicas las más frecuentes fueron *M. vaccae* (n=8), *M. duvalii* (n=7), *M. aurum* (n=6), *Mycobacterium* sp. (n=6), *M. gordonae* (n=4), *M. arupense* (n=4), *M. fortuitum* (n=2), *M. peregrinum* (n=2) y *M. monacense/acapulcensis* (n=2).

Estos resultados sugieren que el agua es una importante fuente de MA, capaces de producir micobacteriosis, por lo que sería importante un monitoreo continuo para estudiar el riesgo potencial que representarían para la salud las especies identificadas.

7. CONCLUSIONES

- El PRA es una técnica rápida y fácil de implementar en un laboratorio de baja complejidad, a diferencia de las pruebas bioquímicas, pero se requiere de otras técnicas moleculares complementarias, específicamente cuando se desea identificar micobacterias de origen ambiental pigmentadas y de rápido crecimiento o también en aquellos casos que se obtienen posibles nuevos patrones de restricción.
- Las pruebas bioquímicas son de gran utilidad para respaldar los datos obtenidos por técnicas moleculares, principalmente en aquellos casos en los cuales por sí solos, tanto uno u otro método, no pueden definir la especie de *Mycobacterium* aislada.
- Las cepas caracterizadas en las cuales fueron concordantes los patrones PRA con la secuenciación de los genes 16S rARN y *hsp65*, conjuntamente con las pruebas bioquímicas, constituirán parte del cepario de la ciudad de General Pico, La Pampa.
- Las distintas fuentes de agua estudiadas constituyen un importante reservorio de micobacterias ambientales, posibles patógenas oportunistas, de importancia para la salud pública.
- En ninguna de las muestras estudiadas se aislaron los patógenos obligados *M.tuberculosis* y *M. bovis*, así como tampoco *M.avium* subsp. *paratuberculosis*.
- Es conveniente llevar a cabo un registro propio de los patrones de restricción de especies predominantes en el sitio geográfico estudiado pues en un futuro puede contribuir a la identificación de MA productoras de micobacteriosis en pacientes habitantes de la zona.
- De acuerdo a los datos alcanzados y nuestra experiencia adquirida en este estudio pudimos diagramar un esquema simplificado para la identificación de micobacterias ambientales provenientes de muestras de origen ambiental, capaz de ser transferido a otros laboratorios (Anexo 1: Recomendaciones).

8. BIBLIOGRAFÍA

- Adékami T, Berger P, Raoult D y Drancourt M. (2006). *rpoB* gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. IJSEM. 56:133-143.
- .Alcaide F y Esteban J. (2010). Infecciones cutáneas y de partes blandas por micobacterias no tuberculosas. Enferm Infecc Microbiol Clin. 28:46-50.
- Axelrod S, Oschkinat H, Enders J, Schlegel B, Brinkmann V, Kaufmann SH, Haas A y Schaible UE. (2008). Delay of phagosome maturation by a mycobacterial lipid is reversed by nitric oxide. Cell Microbiol. 10:1530–1545.
- Barrera L. (2007). The Basics of Clinical Bacteriology. In: "Tuberculosis 2007: From basic science to patient care." (Eds Palomino JC, Ritacco V y Leão S). Estados Unidos. Amedeo. pp:93-112.
- Barry III CE, Lee RE, Mdluli K, Sampson AE, Schroeder BG, Slayden RA y Yuan Y. (1998) Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. Prog Lipid Res. 37:143–179.
- Barrow WW, Davis TL, Wright EL, Labrousse V, Bachelet M, y Rastogi N. (1995). Immunomodulatory spectrum of lipids associated with *Mycobacterium avium* serovar 8. Infect Immun. 63:126–133.
- Belanger AE, Inamine JM. (2000). Genetics of cell wall biosynthesis, In Molecular genetics of mycobacteria. (Ed. Hatfull GF and Jacobs WR, Jr.) ASM Press, Washington, DC. pp. 191-202
- Belisle JT, Vissa VD, Sievert T, Takayama K, Brennan PJ y Besra GS. (1997). Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. Science 276:1420–1422.
- Bercovier H, Kafri O y Sela S. (1986). Mycobacteria possess a surprisingly small number of ribosomal RNA genes in relation to the size of their genome. Biochem Biophys Res Commun. 136:1136-1141.
- Bergey DH, Harrison FC, Breed RS, Hammer BW y Huntoon FM. (1923) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1st edn. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Bernardelli, A. (2007) Clasificación fenotípica de micobacterias. Manual de Procedimientos. SENASA. Ciudad Autónoma de Bs As. Argentina
- Berthet FX, Rasmussen PB, Rosenkrands I, Andersen P y Gicquel B. (1998). A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). Microbiol. 144:3195-203.
- Besra GS y Brennan PJ. (1997). The mycobacterial cell wall: biosynthesis of arabinogalactan and lipoarabinomannan. Biochem Society transactions. 25: 845-850.
- Brennan PJ y Besra GS (1997). Structure, function and biogenesis of the mycobacterial cell wall. Biochem Society Transactions. 25:188–194
- Brennan PJ y Nikaído H. (1995) The envelope of mycobacteria. Annu Rev Biochem. 64: 29–63.
- Briancesco R, Semproni M, Della Libera S, Sdanganelli M y Lucia Bonadonna L. (2010). Non-tuberculous mycobacteria and microbial populations in drinking water distribution systems Ann Ist Super Sanità. 46: 254-258
- Brianesi UA, Santiago AS, Oliveira JCF, Viananiero C. (2012) Isolamiento e identificação de micobactérias ambientais provenientes da fundação parque zoológico de São Paulo. XXI Congreso Latinoamericano de Microbiología (XXI ALAM), Santos, Brasil. 28 de octubre al 01 de noviembre.
- Briken V, Porcelli SA, Besra GS y Kremer L. (2004). Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. Mol Microbiol. 53:391–403.
- Browne SK, Zaman R, Sampaio EP, Jutivorakool K, Rosen LB, Ding L, Pancholi MJ, Yang LM, Priel DL, Uzel G, Freeman AF, Hayes CE, Baxter R, Cohen SH y Holland SM. (2012). Anti-CD20 (rituximab) therapy for anti-IFN- γ autoantibody-associated nontuberculous mycobacterial infection. Blood. 119:3933-3939.

- Brunello F, Ligozzi M, Cristelli E, Bonora S, Tortoli E y Fontana R. (2001). Identification of 54 mycobacterial species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene. *J. Clin Microbiol.* 39:2799–2806.
- Borrero R, Álvarez N, Reyes F, Sarmiento ME y Acosta A. (2011). *Mycobacterium tuberculosis*: factores de virulencia. *Vaccinmonitor.* 20:34-38.
- Camacho LR, Constant P, Raynaud C, Laneelle MA, Triccas JA, Gicquel B, Daffe M y Guilhot C. (2001). Analysis of the phthiocerol dimycocerosate locus of *Mycobacterium tuberculosis*. Evidence that this lipid is involved in the cell wall permeability barrier. *J Biol Chem.* 276: 19845–19854.
- Carlsson F, Joshi SA, Rangell L y Brown EJ. (2009). Polar localization of virulence-related Esx-1 secretion in mycobacteria. *PLoS Pathog.* 5:e1000285.
- Carter G, Wu M, Drummond DC y Bermudez LE. (2003). Characterization of biofilm formation by clinical isolates of *Mycobacterium avium*. *J Med Microbiol.* 52:747–752.
- Castaño D y Rojas M. (2010). Alteraciones en el reclutamiento y activación de proteínas Rab durante la infección micobacteriana. *Biomédica.* 30: 283-308
- Chang YH, Shangkuan YH, Lin HC y Liu HW. (2003). PCR assay of the *groEL* gene for detection and differentiation of *Bacillus cereus* group cells. *Appl Environ Microbiol.* 69:4502–4510.
- Chatterjee D y Khoo KH. (1998). Mycobacterial lipoarabinomannan: an extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects. *Glycobiol.* 8:113–120.
- Chimara E, Ferrazoli L, Misuka Ueki SY, Martins MC, Durham AM, D Arbeit R y Cardoso Leão S. (2008). Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-*hsp65* in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-*hsp65* patterns. *BMC Microbiol* 8:48.
- Cirillo JD, Falkow S, Tompkins LS y Bermudez LE. (1997) Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect Immun.* 65:3759–3767.
- Clemens DL y Horwitz MA. (1996) The *Mycobacterium tuberculosis* phagosome interacts with early endosomes and is accessible to exogenously administered transferrin. *J Exp Med.* 184: 1349–1355.
- Comisión Científica de Micobacterias. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. (2005). Manual de Diagnóstico de Micobacterias de importancia en Medicina Veterinaria 1ª Ed. Santa Fe (Argentina).
- Cooksey RC, de Waard JH, Yakrus MA, Rivera I, Chopite M, Toney SR, Morlock GP y Butler WR. (2004). *Mycobacterium cosmeticum* sp. nov., a novel rapidly growing species isolated from a cosmetic infection and from a nail salon. *Int J Syst Evol Microbiol.* 54:2385-2391
- Coutanceau E, Decalf J, Martino A, Babon A, Winter N Cole ST, Albert ML y Demangel C (2007) Selective suppression of dendritic cell functions by *Mycobacterium ulcerans* toxin mycolactone. *J Exp Med* 204: 1395-1403.
- Covert TC, Rodgers MR, Reyes AL, Stelma GN Jr. (1999). Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol.* 65:2492-6.
- Culton DA, Lachiewicz AM, Miller BM, Miller MB, MacKuen C, Groben P, White B, Cox GM, Stout JE. (2013) Nontuberculous mycobacterial infection after fractionated CO₂ laser resurfacing. *Emerg Infect Dis.* 9: 365-70
- da Costa AR, Lopes ML, Furlaneto IP, de Sousa MS, Batista Lima KV. (2010) Molecular identification of nontuberculous mycobacteria isolates in a Brazilian mycobacteria reference laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis* 68: 390–394.
- Daffe, M, Brennan PJ y McNeil M. (1990). Predominant structural features of the cell wall arabinogalactan of *Mycobacterium tuberculosis* as revealed through characterization of oligoglycosyl alditol fragments by gas chromatography/mass spectrometry and by ¹H and ¹³C NMR analyses. *J Biol Chem.* 265: 6734–6743.

- Daffe M y Draper P. (1998). The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv Microb Physiol.* 39:131–203.
- Daffe M y Etienne G. (1999). The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. *Tuber Lung Dis.* 79:153–169.
- Dailoux M, Laurain C, Weber M y Hartemann Ph. (1999). Water and nontuberculous mycobacteria. *Water Res* 33:2219–2228.
- Da Silva-Rocha A, Barreto W, Campos C, Villalobos M, Fonseca I, Saad M, Degrave WM y Suffys PN. (2002). Novel allelic variants of *Mycobacterium* isolates in Brazil as determined by PCR-restriccion enzyme analysis of hsp 65. *J Clin Microbiol.* 40: 4191-6.
- Demangel C, Stinear TP y Cole ST (2009). Buruli ulcer: reductive evolution enhances pathogenicity of *Mycobacterium ulcerans*. *Nat Rev.* 7:50–60.
- Devallois A, Goh KS y Rastogi N. (1997). Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. *J Clin Microbiol.* 35:2969-73.
- Dulphy N, Herrmann JL, Nigou J, Réa D, Boissel N, Puzo G, Charron D, Lagrange PH y Toubert A. (2007) Intermediate maturation of *Mycobacterium tuberculosis* LAM-activated human dendritic cells. *Cell Microbiol.* 9: 1412–1425.
- Du Moulin GC, Stottmeier KD, Pelletier PA, Tsang AY y Hedley-Whyte J. (1988). Concentration of *Mycobacterium avium* by hospital hot water systems. *JAMA.* 260:1599-601.
- Dvorská L, Barto M, Martin G, Erler W y Pavlík I. (2001) Strategies for differentiation, identification and typing of medically important species of mycobacteria by molecular methods *vet. Med. – Czech.* 46: 309–328.
- Ehlers MR y Daffe M. (1998) Interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and host cells: are mycobacterial sugars the key? *Trends Microbiol.* 6:328-335.
- Falkinham III JO. (2003). The changing pattern of nontuberculous mycobacterial disease. *Can J Infect Dis.* 14: 281–286.
- Falkinham III JO. (2009) Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *J Appl Microbiol.* 107: 356–367.
- Falkinham III JO, Iseman MD, de Haas P y van Soolingen D (2008). *Mycobacterium avium* in a shower linked to pulmonary disease. *J Water Health.* 6:209–213.
- Falkinham III JO, Norton CD y LeChevallier MW. (2001) Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other mycobacteria in drinking water distribution systems. *Appl Environ Microbiol.* 67: 1225–1231.
- Ferdinand S, Legrand E, Goh KS, Berchel M, Mazzarelli G, Sola C, Tortoli E y Rastogi N. (2004). Taxonomic and phylogenetic status of non-tuberculous mycobacteria in a Caribbean setting. *Mol Cell Probes* 18:399–408.
- Field SK, Fisher D y Cowie RL. (2004). *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease in patients without HIV infection. *Chest.* 126:566–581.
- Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, Sabio y García J, Morbidoni HR, de la Paz Santangelo M, Cataldi AA y Bigi F. (2013). Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence.* 4:3-66.
- Fratti RA, Chua J, Vergne I y Deretic V. (2003). *Mycobacterium tuberculosis* glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 5437–5442.
- Fujimora Leite C, Ferracini R, Falcao P, David H, Lévy Prébault V. (1989). Prevalencia e distribucao de micobacterias nas aguas de algumas regioes do estado de Sao Paulo- Brasil. *Rev Microbiol.* 20: 432-441.
- Gao L, Laval F, Lawson E, Groger R, Woodruff A, Morisaki J, Cox J, Daffe M y Brown E. (2003). Requirement for *kasB* in *Mycobacterium* mycolic acid biosynthesis, cell wall impermeability and intracellular survival: implications for therapy, *Mol Microbiol.* 49:1547–1563.

- Gao LY, Guo S, McLaughlin B, Morisaki H, Engel JN y Brown EJ. (2004). A mycobacterial virulence gene cluster extending RD1 is required for cytolysis, bacterial spreading and ESAT-6 secretion. *Mol Microbiol.* 53: 1677–1693.
- Gao LY, Pak M, Kish R, Kajihara K. y Brown EJ. (2006). A mycobacterial operon essential for virulence in vivo and invasion and intracellular persistence in macrophages. *Infect. Immun.* 74: 1757–1767.
- García L M, Garzón MC, Orjuela DL, Mejía G y Llerena, C. (2010). Micobacterias no tuberculosas asociadas a procedimientos de mesoterapia en Colombia, 2004-2007. *Infectio.* 14: 93-96.
- García-Martos P y García-Agudo L. (2012) Infecciones por micobacterias de crecimiento rápido. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 30:192–200.
- García-Navarro X, Barnadas MA, Dalmau J, Coll P, Gurquí M y Alomar A. (2008) *Mycobacterium abscessus* infection secondary to mesotherapy *Clin Exp Dermatol.* 33:658-9
- George K.L, Parker BC, Gruft H y Falkinham JO III (1980). Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. II. Growth and survival in natural waters. *Am Rev Respir Dis* 122: 89–94.
- Gilleron, M, Ronet C, Mempel M, Monsarrat B, Gachelin G y Puzo G. (2001). Acylation state of the phosphatidylinositol mannosides from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guerin and ability to induce granuloma and recruit natural killer T cells. *J Biol Chem.* 276: 34896–34904.
- Glickman MS, Cox JS y Jacobs WR Jr. (2000). A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Cell.* 5:717–27.
- Godoy MJ, Orozco L, Hernández C, DaMata O, De Waard J y González Rico S. (2008). Identificación de micobacterias no tuberculosas: comparación de métodos bioquímicos y moleculares *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología.* 28:96-104.
- Goldberg MB. (2001). Actin-based motility of intracellular microbial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev.* 65:595–626.
- Gomez A, Mve-Obiang A, Vray B, Remacle J, Chemlal K, Meyers W M, Portaels F y Fonteyne P A. (2000). Biochemical and genetic evidence for phospholipase C activity in *Mycobacterium ulcerans*. *Infect Immun.* 68:2995–2997.
- Goodfellow M y Magee JG. (1998). Taxonomy of mycobacteria. In *Mycobacteria I, Basic Aspects.* (Edited by Gangadharam y Jenkins). New York & London: Chapman y Hall. pp. 1–71.
- Grant IR, Ball HJ y Rowe MT. (2002). Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. *Appl Environ Microbiol.* 68:2428-35.
- Guenin-Macé L, Siméone R y Demangel C. (2009). Lipids of pathogenic *Mycobacteria*: contributions to virulence and host immune suppression. *Transbound Emerg Dis.* 56:255-268.
- Guerardel Y, Maes E, Ellass E, Leroy Y, Timmerman P, BesraGS, Locht C, Strecker G y Kremer L. (2002). Structural study of lipomannan and lipoarabinomannan from *Mycobacterium chelonae*. Presence of unusual components with alpha 1,3-mannopyranose side chains. *J Biol Chem.* 277: 30635–30648.
- Harboe M, Oettinger T, Wiker HG, Rosenkrands I y Andersen P. (1996). Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. *Znfect Zmmun* 64:16-22.
- Harmsen D, Dostal S, Roth A, Niemann S, Rothgänger J, Sammeth, M y Richter E. (2003). RIDOM: comprehensive and public sequence database for identification of *Mycobacterium* species. *BMC Infectious Diseases.* 3: 26.
- Hennessee C T, Seo JS, Alvarez A M y Li Q X. (2009). Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading species isolated from Hawaiian soils: *Mycobacterium crocinum* sp. nov., *Mycobacterium pallens* sp. nov., *Mycobacterium rutilum* sp. nov., *Mycobacterium rufum* sp. nov. and *Mycobacterium aromaticivorans* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 59: 378–387.
- Herreros FO, Velho PE, De Moraes AM y Cintra ML. (2009). Cutaneous atypical mycobacteriosis after ultrasound hydrolipoclasia treatment. *Dermatol Surg.* 35:158-60.

- Hilborn ED, Covert TC, Yakrus MA, Harris SI, Donnelly SF, Rice EW, Toney S, Bailey SA y Stelma GN Jr. (2006). Persistence of non tuberculous mycobacteria in a drinking water system after addition of filtration treatment. *Appl Environ Microbiol.* 72:5864–5869.
- Hilborn ED, Yakrus MA, Covert TC, Harris SI, Donnelly SF, Shmitt MT, Toney S, Bailey SA, Stelma GN. (2008). Molecular comparison of *Mycobacterium avium* isolates from clinical and environmental sources. *Appl Environ Microbiol.* 74:4966–4968.
- Hong H, Coutanceau E, Leclerc M, Caleechurn L, Leadlay P y Demangel C. (2008) Mycolactone Diffuses from *Mycobacterium ulcerans*-Infected Tissues and Targets Mononuclear Cells in Peripheral Blood and Lymphoid Organs. *PLoS Negl Trop Dis* 2: e325.
- Horsburgh CR Jr. (1999). The pathophysiology of disseminated *Mycobacterium avium* complex disease in AIDS. *J Infect Dis.* 179:S461–S465.
- Howard ST y Byrd TF. (2000). The rapidly growing mycobacteria: Saprophytes and parasites. *Microbes Infect.* 2:1845–1853.
- Jensen K A. (1932). Reinzüchtung und Typen bestimmung von Tuberkelbazillenstämmen. *Zbl. f. Bakteriol* 125: 222-239.
- Ji YE, Colston MJ, y Cox RA. (1994). The ribosomal RNA (*rrn*) operons of fast-growing mycobacteria: primary and secondary structures and their relation to *rrn* operons of pathogenic slow-growers. *Microbiol.* 140:2829-2840.
- Johansen KA, Gill RE y Vasil ML. (1996) Biochemical and molecular analysis of phospholipase C and phospholipase D activity in mycobacteria. *Infect Immun.* 64:3259–3266.
- Jorge MC, Alito A, Bernardelli A, Canal A M, Cataldi A, Cicuta ME, Gentile F, Kistermann JC, Magnano G, Martínez Vivot ME, Oriani DS, Paolicchi FA, Pérez AM, Romano MI, Schneider M, Torres P, Zumárraga MJ. (2005) Manual de Diagnóstico de Micobacterias de importancia en Medicina Veterinaria. Comisión Científica de Micobacterias Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. Santa Fe (Argentina) pp. 1-132.
- Kamala T, Paramasivan CN, Herbert D, Venkatesan P y Prabhakar R. (1994). Isolation and Identification of environmental mycobacteria in the *Mycobacterium bovis* BCG trial area of south India. *Appl. Environ Microbiol.* 60: 2180-2183
- Katoch VM. (2004). Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). *Indian J Med Res.* 120:290-304.
- Kazda J. (1983) The principles of the ecology of mycobacteria. En: Radledge and Stanford-Biology of Mycobacteria. Vol 2. London: Academic Press. pp:323-42.
- Kazda J, Pavlik I, Falkinham III JO y Hruska K. (2009). The Ecology of Mycobacteria: Impact on Animal's and Human's Health. 1° Ed. Springer. Dordrecht Heidelberg London, New York. pp:7-11.
- Kim H, Kim SH, Shim TS, Kim MN, Bai GH, Park YG, Lee SH, Cha CY, Kook YH y Kim BJ (2005). PCR restriction fragment length polymorphism analysis (PRA)-algorithm targeting 644 bp Heat Shock Protein 65 (*hsp65*) gene for differentiation of *Mycobacterium* spp. *J Microbiol Methods.* 62:199-209.
- Kirschner, P., Meier, K. A. y Böttger, E. C. (1993). Genotypic identification and detection of mycobacteria: facing novel and uncultured pathogens. In *Diagnostic Molecular Microbiology*,. Edited by D. H. Persing, T. F. Smith, F. C. Tenover & T. J. White. Washington, DC: American Society for Microbiology. pp. 173–190
- Kirschner P y Böttger EC. (1998). *Mycobacteria Protocols Methods in Molecular Biology*. Edited by T. Parish and N. G. Stocker, Humana Press Inc. Totowa, New Jersey. 101: 349-361.
- Kirschner RA, Parker BC y Falkinham JO. (1999). Humic and fulvic acids stimulate the growth of *Mycobacterium avium*. *FEMS Microbiol Ecol.* 30: 327–332
- Kishi Y. (2011). Chemistry of mycolactones, the causative toxins of Buruli ulcer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108: 6703–6708.

- Kwok AY, Su SC, Reynolds RP, Bay SJ, Av-Gay Y, Dovichi NJ y Chow AW. (1999). Species identification and phylogenetic relationships based on partial HSP60 gene sequences within the genus *Staphylococcus*. *Int J Syst Bacteriol.* 49:1181–1192.
- Lavania M, Katoch K, Katoch VM, Gupta AK, Chauhan DS, Sharma R, Gandhi R, Chauhan V, Bansal G, Sachan P, Sachan S, Yadav VS y Jadhav R. (2008). Detection of viable *Mycobacterium leprae* in soil samples: insights into possible sources of transmission of leprosy. *Infect. Genet Evol.* 8:627–631.
- Leão SC, Martin A, Mejia GI, Palomino JC, Robledo J, Telles MAS y Portaels F. (2004). Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. Vanden Broelle, Bruges, Belgium.
- Leão SC, Bernardelli A, Cataldi A, Zumarraga M, Robledo J, Realpe T, Mejía G.I., da Silva Telles M.A., Chimara E., Velazco M., Fernandez J., Rodrigues P.A., Guerrero M.I., León C.I., Porras T.B., Rastogi N., Goh K.S., Suffys P., da Silva Rocha A., dos Santos Netto D., Ritacco V., López B., Barrera L., Palomino J.C., Martin A. y Portaels F. (2005). Multicenter evaluation of mycobacteria identification by PCR restriction enzyme analysis in laboratories from Latin America and the Caribbean. *J Microbiol Methods.* 61:193-9.
- Le Dantec C, Duguet JP, Montiel A, Dumoutier N, Dubrou S y Vincenti V. (2002) Chlorine Disinfection of Atypical Mycobacteria Isolated from a Water Distribution System *Appl Environ Microbiol.* 68: 1025–1032.
- Lee YC y Ballou CE. (1965). Complete structures of the glycopospholipids of mycobacteria. *Biochem.* 4:1395–1404.
- Lee ES, Lee MY, Han SH y Ka JO (2008) Occurrence and Molecular Differentiation of Environmental Mycobacteria in Surface Waters. *J Microbiol Biotechnol.* 18: 1207–1215.
- Legrand E, Goh KS, Sola C y Rastogi N. (2000). Description of a novel *Mycobacterium simiae* allelic variant isolated from Caribbean AIDS patients by PCR-restriction enzyme analysis and sequencing of *hsp65* gene. *Mol. Cell. Probes.* 14:355–363.
- Lemassu A y Daffe M. (1994). Structural features of the exocellular polysaccharides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem J.* 297:351–357.
- Liu J, Barry CE, Besra III GS y Nikaido H. (1996) Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall. *J Biol Chem.* 271: 29545–29551.
- Liu R, Yu Z, Zhang H, Yang M, Shi B y Liu X. (2012). Diversity of bacteria and mycobacteria in biofilms of two urban drinking water distribution systems. *Can J Microbiol.* 58:261-270.
- Liu G, Verberk JQJC y Van Dijk JC. (2013). Bacteriology of drinking water distribution systems: an integral and multidimensional review. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97: 9265-9276.
- Lopez Marin LM, Laneelle MA, Prome D y Daffe M. (1993). Structures of the glycopeptidolipid antigens of two animal pathogens: *Mycobacterium senegalense* and *Mycobacterium porcinum*. *Eur J Biochem.* 215:859–866.
- Lorian V. (1968). Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and Runyon Group 3 “V” strains on direct cord-reading agar. *Am. Rev Respir Dis.* 97: 1133-1135.
- Löwenstein E. (1931). Die Züchtung der Tuberkelbazillen aus dem stromenden Blute Tuberkelbazillenstämmen. *Zentralbl Bakterio* 120:127-129.
- Malik ZA, Denning MG y Kusner DJ (2000). Inhibition of Ca (2+) signaling by *Mycobacterium tuberculosis* is associated with reduced phagosome-lysosome fusion and increased survival within human macrophages. *J Exp Med.* 191: 287–302.
- Malik ZA, Iyer SS y Kusner DJ (2001). *Mycobacterium tuberculosis* phagosomes exhibit altered calmodulin-dependent signal transduction: contribution to inhibition of phagosome-lysosome fusion and intracellular survival in human macrophages. *J Immunol.* 166: 3392–3401.
- Manuel CM, Nunes OC y Melo LF. (2007). Dynamics of drinking water biofilm in flow/non-flow conditions. *Water Res.* 41: 551-562.

- Marsollier L, Robert R, Aubry J, Saint André JP, Kouakou H, Legras P, Manceau AL, Mahaza C y Carbonnelle B (2002) Aquatic insects as a vector for *Mycobacterium ulcerans*. *Appl Environ Microb* 68:4623–4628.
- Marsollier L, Brodin P, Jackson M, Kordulákova J, Tafelmeyer P, Carbonnelle E, Aubry J, Milon G, Legras P, Saint-Andre JP, Leroy C, Cottin J, Joly-Guillou ML, Reyssset G y Cole ST. (2007) Impact of *Mycobacterium ulcerans* biofilm on transmissibility to ecological niches and Buruli ulcer pathogenesis. *PloS Pathog* 3: e62.
- Martinez A, Torello S, Kolter R. (1999). Sliding motility in mycobacteria. *J Bacteriol.* 181:7331–7338.
- Matsuoka M, Izumi S, Budiawan T, Nakata N y Saeki K. (1999). *Mycobacterium leprae* DNA in daily using water as a possible source of leprosy infection. *Indian J Lepr.* 71: 61–67.
- McGarvey J y Bermudez LE. (2002). Pathogenesis of nontuberculous mycobacteria infection. *Clin Chest Med* 23: 569–583.
- McNeil MR y Brennan PJ. (1991). Structure, function and biogenesis of the cell envelope of mycobacteria in relation to bacterial physiology, pathogenesis and drug resistance; some thoughts and possibilities arising from recent structural information. *Res Microbiol.* 142: 451–463.
- Miller N, Infante S y Cleary T. (2000). Evaluation of the LiPA Mycobacteria assay for identification of mycobacterial species from BACTEC 12B bottles. *J. Clin. Microbiol.* 38:1915–1919.
- Miltner CE, Bermudez LE. (2000). *Mycobacterium avium* grown in *Acanthamoeba castellanii* is protected from the effects of antimicrobials. *Antimicrob Ag Chem.* 44:1990-1994.
- Mustafa T, Bjune TG, Jonsson R, Pando RH y Nilsen R. (2001). Increased expression of fas ligand in human tuberculosis and leprosy lesions: a potential novel mechanism of immune evasion in mycobacterial infection. *Scand J Immunol.* 54:630–9.
- Murcia MI, Cardoso-Leão S, Rittaco V, Palenque E, Oliveira RS, Reniero A, Menendez MC, da Silva Telles MA, Hadad DJ, Barrera L y García MJ. (2004). Distribución de patrones PRA en aislamientos clínicos del complejo *Mycobacterium avium* procedentes de España y Suramérica. *Biomédica.* 24:60–64.
- Mve-Obiang A, Lee RE, Portaels F y Small PL. (2003). Heterogeneity of mycolactones produced by clinical isolates of *Mycobacterium ulcerans*: implications for virulence. *Infect Immun.* 71:774–783.
- Nigou J, Gilleron M, y Puzo G. (2003): Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis. *Biochemistry* 85. 153–166.
- Nigou J, Gilleron M, Rojas M, Garcia LF, Thurnher M y Puzo G. (2002). Mycobacterial lipoarabinomannans: modulators of dendritic cell function and the apoptotic response. *Microbes Infect* 4:945–953.
- Norton C D y LeChevallier M W. (2000). A pilot study of bacteriological population changes through potable water treatment and distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:268–276.
- Norton CD, LeChevallier MW y Falkinham JO III. (2004) Survival of *Mycobacterium avium* in a model distribution system. *Water Res.* 38:1457–1466.
- Oliveira RS, Sircili MP, Oliveira EMD, Balian SC, Ferreira-Neto JS y Leão SC (2003) Identification of *Mycobacterium avium* genotypes with distinctive traits by combination of IS1245-RFLP and restriction analysis of *hsp65*. *J Clin Microbiol.* 41:44–49.
- Oliveira RS, Sircili MP, Ueki SY, Telles MA, Schnabel B, Briones MR y Leao SC. (2000). PCR-restriction enzyme analysis of a bone marrow isolate from a human immunodeficiency virus-positive patient discloses polyclonal infection with two *Mycobacterium avium* strains. *J Clin Microbiol.* 38:4643–4645.
- Oliveira TES, Holanda MV, Macedo MLB, Marques LEC y Sabadía JAB. (2012) Identificação de micobactérias atípicas em amostras de água ambientais em município do estado do Ceará. XXI Congresso Latinoamericano de Microbiología (XXI ALAM), Santos, Brasil. 28 de octubre al 01 de noviembre
- Oriani DS y Sagardoy MA. (2002). Nontuberculous mycobacteria in soils of La Pampa province (Argentina). *Rev Arg Microbiol.* 34:132-137

- Pethe K, Swenson DL, Alonso S, Anderson J, Wang C y Russell DG. (2004) Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* mutants defective in the arrest of phagosome maturation. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 13642–13647.
- Picardeau M, Prod'homme G, Raskine L, LePennec MP y Vincent V. (1997). Genotypic differentiation of five subspecies of *Mycobacterium kansasii*. *J. Clin. Microbiol.* 35:25–32.
- Piersimoni C y Scarparo C. (2009). Extrapulmonary infections associated with nontuberculous mycobacteria in immunocompetent persons. *Emerg Infect Dis.* 15:1351–1358.
- Portaels, F. (1995). Epidemiology of mycobacterial diseases. *Clinics Dermatol.* 13: 207–222.
- Ranger BS, Mahrous EA, Mosi L, Adusumilli S, Lee RE, Colorni A, Rhodes M y Small PL. (2006). Globally distributed mycobacterial fish pathogens produce a novel plasmid-encoded toxic macrolide, mycolactone F. *Infect Immun.* 74: 6037–6045.
- Rastogi N. (2003). An introduction to bacterial taxonomy, structure, drug resistance, and pathogenesis. In: Dionisio D. (Ed), *Textbook-Atlas of intestinal Infections in AIDS*. Springer-Verlag, Milan, Italy, pp.89-115.
- Ratledge C. (1984) Metabolism of iron and other metals by mycobacteria. In: *The Mycobacteria a Sourcebook, Part A* (eds G.P Kubica y L. G. Wayne) New York: Marcel Dekker, pp.603-627.
- Raynaud C, Guilhot C, Rauzier J, Bordat Y, Pelicic V, Manganelli R, Smith I, Gicquel B y Jackson M. (2002). Phospholipases C are involved in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol.* 45: 203–217.
- Recht J, Martinez A, Torello S y Kolter R. (2001). Sliding motility and biofilm formation in mycobacteria. *Acta Cient Venez.* 52:45–49.
- Reischl U, Melzl H, Kroppenstedt RM, Miethke T, Naumann L, Mariottini A, Mazzarelli G, y Tortoli E. (2006). *Mycobacterium monacense* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 56: 2575-2578.
- Rhodes MW, Kator H, McNabb A, Deshayes C, Reytrat JM, Brown-Elliott BA, Wallace R Jr, Trott KA, Parker JM, Lifland B, Osterhout G, Kaattari I, Reece K, Vogelbein W y Ottinger CA. (2005). *Mycobacterium pseudoshottsii* sp. nov., a slowly growing chromogenic species isolated from Chesapeake Bay striped bass (*Morone saxatilis*). *Int J Syst Evol Microbiol.* 55:1139–1147.
- Richter E, Niemann S, Rüscher-Gerdes S y Hoffner S. (1999). Identification of *Mycobacterium kansasii* by using a DNA probe (AccuProbe) and molecular techniques. *J. Clin. Microbiol.* 37:964–970.
- Ringuet H, Akoua-Koffi C, Honore S, Varnerot A, Vincent V, Berche P, Gaillard JL y Pierre-Audigier C. (1999). *hsp65* sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 37:852–857.
- Ripoll F, Deshayes C, Pasek S, Laval F, Beretti JL, Biet F, Risler JL, Daffe M, Etienne G, Gaillard JL y Reytrat JM (2007). Genomics of glycopeptidolipid biosynthesis in *Mycobacterium abscessus* and *M. chelonae*. *BMC Genomics.* 8:114.
- Rousseau C, Winter N, Pivert E, Bordat Y, Neyrolles O, Ave P, Huerre M, Gicquel B y Jackson, M. (2004). Production of phthiocerol dimycocerosates protects *Mycobacterium tuberculosis* from the cidal activity of reactive nitrogen intermediates produced by macrophages and modulates the early immune response to infection. *Cell Microbiol.* 6: 277–287.
- Russell DG., Dant J y Sturgill-Koszycki S (1996). *Mycobacterium avium*- and *Mycobacterium tuberculosis*-containing vacuoles are dynamic, fusion-competent vesicles that are accessible to glycosphingolipids from the host cell plasmalemma. *J. Immunol.* 156: 4764–4773.
- Saavedra R, Segura E, Leyva R, Esparza LA y Lopez-Marin LM. (2001). Mycobacterial di-*O*-acyl-trehalose inhibits mitogen- and antigen-induced proliferation of murine T cells in vitro. *Clin Diagn Lab Immunol.* 8:1081-1088
- Salik D y Del Marmol V. (2011). Refractory Hand Ulceration: A Case of Chronic Ulceration and Sporotrichoid Spread in a Fish Tank Hobbyist following *Mycobacterium marinum*. *Infection Case Rep Dermatol.* 3: 137–141.

- Scarparo C, Piccoli P, Rigon A, Ruggiero G, Nista D y Piersimoni C. (2001). Direct identification of mycobacteria from MB/BacT Alert 3D bottles: comparative evaluation of two commercial probe assays. *J. Clin. Microbiol.* 39:3222-3227.
- Schelonka RL, Ascher P, McMahon DP, Drehner DM y Kuski MR. (1994). Catheter-related sepsis caused by *Mycobacterium avium* complex. *Ped Infect Dis J.* 13:236-8.
- Schorey JS y Sweet, L. (2008) The mycobacterial glycopeptidolipids: structure, function, and their role in pathogenesis. *Glycobiol.* 18: 832–841.
- Senna SG, Battilana J, Costa JC, Silva MG, Duarte RS, Fonseca LS, Suffys PN y Bogo M. (2008) Sequencing of *hsp65* Gene for Identification of *Mycobacterium* Species Isolated from Environmental and Clinical Sources in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol.* 46: 3822–3825.
- Shojaei H, Magee JG, Freeman R, Yates M, Horadagoda NU y Goodfellow M (2000) *Mycobacterium elephantis* sp. nov., a rapidly growing non-chromogenic *Mycobacterium* isolated from an elephant. *Int J Syst Evol Microbiol.* 50: 1817-20.
- Siddiqi, Salman H y Rüscher-Gerdes S (2006). Procedure Manual For BACTEC MGIT 960 TB System.
- Soini H y Musser JM. (2001). Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clin.Chem.*, 47:809-14.
- Sompolinsky D, Lagziel A, Naveh D y Yankilevitz T. (1978). *Mycobacterium haemophilum* sp. nov., a new pathogen of humans. *Int J Syst Bacteriol* 28:67–75.
- Springer B, Stockman L, Teschner K, Roberts GD y Böttger EC. (1996). Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. *J Clin Microbiol.* 34:296-303.
- Stamm L y Brown E. (2004). *Mycobacterium marinum*: the generalization and specialization of a pathogenic mycobacterium, *Microbes Infect.* 6:1418–1428.
- Stamm LM, Morisaki JH, Gao LY, Jeng RL, McDonald KL, Roth R, Takeshita S, Heuser J, Welch, MD y Brown EJ. (2003). *Mycobacterium marinum* escapes from phagosomes and is propelled by actin-based motility. *J. Exp. Med.* 198, 1361–1368.
- Steed KA y Falkinham JO III. (2006). Effect of growth in biofilms on chlorine susceptibility of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *Appl Environ Microbiol.* 72: 4007–4100.
- Steingrube VA, Brown BA, Gibson JL, Wilson RW, Brown J., Blacklock Z., Jost K., Locke S, Ulrich RF y Wallace RJ Jr., (1995). DNA amplification and restriction endonuclease analysis for differentiation of 12 species and taxa of *Nocardia*, including recognition of four new taxa within the *Nocardia asteroides* complex. *J. Clin. Microbiol.* 33:3096-101.
- Stokes RW, Norris-Jones R, Brooks DE, Beveridge TJ, Doxsee D y Thorson LM. (2004). The glycan-rich outer layer of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis* acts as an antiphagocytic capsule limiting the association of the bacterium with macrophages. *Infect Immun.* 72: 5676-5686.
- Stonebrink B. (1958). The use of a pyruvate containing egg medium in the culture of isoniazid resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis*. *Acta Tuberc Scand.* 35: 67-80.
- Suffys PN, Da Silva RA, De Oliveira M, Campos CE, Barreto AM, Portaels F, Rigouts L, Wouters G, Jannes G, van Reybroeck G., Mijs W y Vanderborght B. (2001). Rapid identification of Mycobacteria to the species level using INNO-LiPA Mycobacteria, a reverse hybridization assay. *J Clin Microbiol.* 39:4477-82.
- Sweet L y Schorey JS. (2006). Glycopeptidolipids from *Mycobacterium avium* promote macrophage activation in a TLR2- and MyD88-dependent manner. *J Leukoc Biol.* 80:415–423.
- Taylor RH, Falkinham JO, Norton CD y LeChevallier MW. (2000) Chlorine, chloramine, chlorine dioxide, and ozone susceptibility of *Mycobacterium avium*. *Appl Environ Microbiol.* 66:1702-7.
- Taylor TB, Patterson C, Hale Y y Safranek WW. (1997). Routine use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacteria in liquid media. *J. Clin. Microbiol.* 35:79–85.

- Telenti A, Marchesi F, Balz F, Bally E, Böttger E y Bodmer T. (1993). Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol.* 3: 175-178.
- Theodorou D J, Theodorou SJ, Kakitsubata Y, Sartoris DJ y Resnick D. (2001). Imaging Characteristics and Epidemiologic Features of Atypical Mycobacterial Infections Involving The Musculoskeletal System. *American Journal of Roentgenology.* 176: 341-349.
- Thomas V y McDonnell G. (2007). Relationship between mycobacteria and amoebae: ecological and epidemiological concerns. *Lett Appl Microb.* 45:349-57.
- Torrado E, Adusumilli S, Fraga AG, Small PLC, Castro AG y Pedrosa J. (2007) Mycolactone-mediated inhibition of tumor necrosis factor production by macrophages infected with *Mycobacterium ulcerans* has implications for the control of infection. *Infect Immun.* 75: 3979–3988.
- Tortoli E. (2006). The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 48:159-178.
- Tortoli E, Cichero P, Piersimoni C, Simonetti T, Gesu G y Nista D (1999). Use of BACTEC MGIT 960 for Recovery of Mycobacteria from Clinical Specimens: Multicenter Study. *J Clin Microbiol.* 37: 3578-3582.
- Tortoli E, Bartoloni A, Bottger EC, Emler S, Garzelli C, Magliano E, Mantella A, Rastogi N, Rindi L, Scarparo C y Urbano P (2001). Burden of unidentifiable mycobacteria in a reference laboratory. *J Clin Microbiol.* 39: 4058–4065.
- Trott KA, Stacy BA, Lifland BD, Diggs HE, Harland RM, Khokha MK, Grammer TC y Parker JM. (2004) Characterization of a *Mycobacterium ulcerans*-like infection in a colony of African tropical clawed frogs (*Xenopus tropicalis*). *Comp Med.* 54:309–317.
- Turenne CY, Tschetter L, Wolfe J y Kabani A. (2001). Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: identifying nontuberculous Mycobacterium species. *J Clin Microbiol.* 39: 3637-3648.
- Vaerewijck MJM, Huys G, Palomino JC, Swings J y Portaels F. (2005). Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. *FEMS Microbiol Rev.* 29:911-934.
- van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluitsma D, VanZon M, Pierson J, Brenner M y Peters PJ. (2007). *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell.* 129:1287–1298.
- van Ingen J, de Zwaan R, Dekhuijzen R, Boeree M y van Soolingen D. (2009). Region of difference 1 in nontuberculous *Mycobacterium* species adds a phylogenetic and taxonomical character. *J Bacteriol.* 191:5865-5867.
- Varki A, Cumming R, Esko J, Freeze H, Hart G, Marth J. Editors (1999). Bacterial polysaccharides. In: *Essential of glycobiology.* NY: Cold Spring Harbor Press. pp.321-332.
- Vergne I y Daffe M. (1998) Interaction of mycobacterial glycolipids with host cells. *Front Biosci.* 3:d865-d876.
- Vergne I, Chua J, Lee HH, Lucas M, Belisle J y Deretic V (2005) Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 4033–4038.
- Vergne, I, Chua J, Singh SB y Deretic V. (2004) Cell biology of *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20: 367–394.
- Viale AM, Arakaki AK, Soncini FC y Ferreyra RG. (1994). Evolutionary relationships among eubacterial groups as inferred from GroEL (chaperonin) sequence comparisons. *Int J Syst Bacteriol.* 44:527–533.
- Wagner D y Young LS. (2004). Nontuberculous mycobacterial infections: a clinical review. *Infection* 32:257-270.
- Wallace RJ Jr., Brown BA y Griffith DE. (1998) Nosocomial outbreaks/pseudo outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria. *Ann Rev Microb.* 52:453-90.
- Wallace RJJ, Brown-Elliott BA, Wilson RW, Mann L, Hall L, Zhang Y, Jost KC, Brown JM, Kabani A, Schinsky MF, Steigerwalt AG, Crist CJ, Roberts GD, Blacklock Z, Tsukamura M, Silcox V y Turenne

- C. (2004) Clinical and Laboratory Features of *Mycobacterium porcinum*. *J Clin Microbiol.* 42: 5689–5697.
- Wayne LG y Kubica GP. (1986). Genus *Mycobacterium*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. (Edited by Sneath, Mair, Sharpe & Holt). Baltimore: Williams & William. pp. 1435-1457.
- Wayne LG. (1967). Selection of characters for an Adansonian analysis of mycobacterial taxonomy. *J Bacteriol.* 93:1382-1391.
- Wayne LG, Krichevsky EJ, Love LI, Johnson R y Krichevsky MI. (1980). Taxonomic probability matrix for use with slowly growing mycobacteria. *Int J Syst Bacteriol* 30:528-538.
- Welin A, Winberg ME, Abdalla H, Särndahl E, Rasmusson B, Stendahl O y Lerm M. (2008). Incorporation of *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan into macrophage membrane rafts is a prerequisite for the phagosomal maturation block. *Infect Immun.* 76: 2882–2887.
- Whipps CM, Butler WR, Pourahmad F, Watral V G y Kent ML. (2007). Molecular systematics support the revival of *Mycobacterium salmoniphilum* (ex Ross 1960) sp. nov., nom. rev., a species closely related to *Mycobacterium chelonae*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57:2525–2531.
- Whitman WB, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo, ME, Ludwig W, Suzuki K. (Eds.). (2012) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2 Ed. Volume 5: The Actinobacteria Parte A. Springer.
- Williams MM, Yakrus MA, Arduino MJ, Cooksey RC, Crane CB, Banerjee SN, Hilborn ED y Donlan RM (2009): Structural analysis of biofilm formation by rapidly and slowly growing nontuberculous mycobacteria. *Appl Environ Microbiol.* 75: 2091–2098.
- Wirth SE, Krywy JA, Aldridge BB, Fortune SM, Fernandez-Suarez M, Gray TA y Derbyshire KM. (2012). Polar assembly and scaffolding proteins of the virulence-associated ESX-1 secretory apparatus in mycobacteria. *Mol Microbiol.* 83:654-64.
- Wolinsky, E. (1995). Mycobacterial lymphadenitis in children: A prospective study of 105 nontuberculous cases with long-term follow-up. *Clin Infect Dis.* 20:954-63.
- Wong DA, Yip PC, Tse DL, Tung VW, Cheung DT y Kam KM. (2003) Routine use of a simple low-cost genotypic assay for the identification of mycobacteria in a high throughput laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis* 47:421–426.
- World Health Organization. (2004). Pathogenic mycobacteria in water. A guide to public health consequences, monitoring and management. Pedley S, Bartram J, Rees G, Dufour A, Cotruvo J (Ed.). London: IWA Publishing.
- Yamazaki Y, Danelishvili L, Wu M, Hidaka E, Katsuyama T, Stang B, Petrofsky M, Bildfell R y Bermudez LE. (2006). The ability to form biofilm influences *Mycobacterium avium* invasion and translocation of bronchial epithelial cells. *Cell Microbiol.* 8:806–814.
- Yamazaki Y, Danelishvili L, Wu M, Macnab M y Bermudez LE. (2006a). *Mycobacterium avium* genes associated with the ability to form a biofilm. *Appl Environ Microbiol.* 72:819–825.
- Yip MJ, Porter J, Fyfe J, Lavender C, Portaels F, Rhodes M, Kator H, Colorni A, Jenkin GA y Stinear T. (2007). Evolution of *Mycobacterium ulcerans* and other mycolactone producing mycobacteria from a common *Mycobacterium marinum* progenitor. *J Bacteriol* 189:2021–2029.
- Yuan Y, Lee RE, Besra GS, Belisle JT y Barry CE (1995). Identification of a gene involved in the biosynthesis of cyclopropanated mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92: 6630–6634.
- Zumárraga MJ, Maito J, Gioffré A, Gavidia M, Tirante L, Aguirre N, Nishinakamasu V, Vera P, Puebla A, Cataldi A. (2012). PCR-RFLP (PRA) en micobacterias: ¿nuevos patrones u otras especies bacterianas? En AVLD. XIX REUNIÓN CIENTÍFICA TÉCNICA. Resúmenes. Mnemosyne, Bs. As. pp:199-200.

ANEXO 1 - RECOMENDACIONES

Esquema general de identificación de micobacterias a partir de muestras de agua

Los resultados obtenidos nos permitieron diagramar un esquema de identificación de especies de MA a partir de muestras de origen ambiental que se adecue a nuestro laboratorio. En el Figura 18 se puede observar dicho esquema.

Luego de ser procesadas, las muestras de agua se cultivaron a tres temperaturas diferentes: 25, 32 y 42°C. A 42°C no se obtuvieron aislamientos en ninguna de las muestras de agua estudiadas. Es de destacar que algunas MA pueden no crecer por encima de 35°C. Por otro lado las cepas con temperatura de crecimiento óptimo cercano a 35-37°C fueron capaces de crecer a 32°C.

En cuanto a los medios de cultivo, se utilizaron Löwestein Jensen, Stonebrink y Herrold con micobactina J. Es importante considerar que algunas cepas recuperadas a partir de este último, cuando se repicaron en Löwenstein Jensen su velocidad de crecimiento disminuyó considerablemente.

Una vez determinado la velocidad de crecimiento y la capacidad de formar pigmentos en presencia o ausencia de luz de las colonias BAAR positivas, es recomendable realizar PRA y pruebas bioquímicas más comunes: crecimiento a 42°C, reducción de nitrato, arilsulfatasa 3 días y 2 semanas, hidrólisis del tween 80, urea, crecimiento en NaCl al 5%, toma de hierro, catalasa semicuantitativa (SC), catalasa a 68°C, hidroxilamina, utilización de citrato y manitol. Las pruebas β -galactosidasa, reducción de telurito, pirazinamidasa y crecimiento a 45°C en aquellos casos que ayudarían a definir la especie.

Nosotros observamos que las cepas de lento crecimiento tuvieron un alto porcentaje de concordancia entre el PRA y las pruebas bioquímicas. El mismo comportamiento se registró para las cepas rápidas y no cromógenas. En ambos casos no sería necesaria la secuenciación.

Por otro lado podríamos aconsejar que se utilice la técnica de PRA para la identificación de aquellas cepas rápidas y fotocromógenas compatibles con *M.vaccae*, y no en el caso del resto de aislamientos pigmentados y de rápido crecimiento, los cuales deberían secuenciarse, ya que hemos observado gran variabilidad en sus patrones de

restricción y pruebas bioquímicas. En este estudio el 53,57% de los aislamientos correspondieron a este tipo de cepas.

Tanto para la tipificación a través de pruebas bioquímicas como por la técnica de PRA, es un requisito ineludible que el aislamiento provenga de un cultivo puro para evitar interpretaciones erróneas. Cuando se manipulan muestras ambientales es frecuente obtener aislamientos mixtos bajo un mismo fenotipo de colonia.

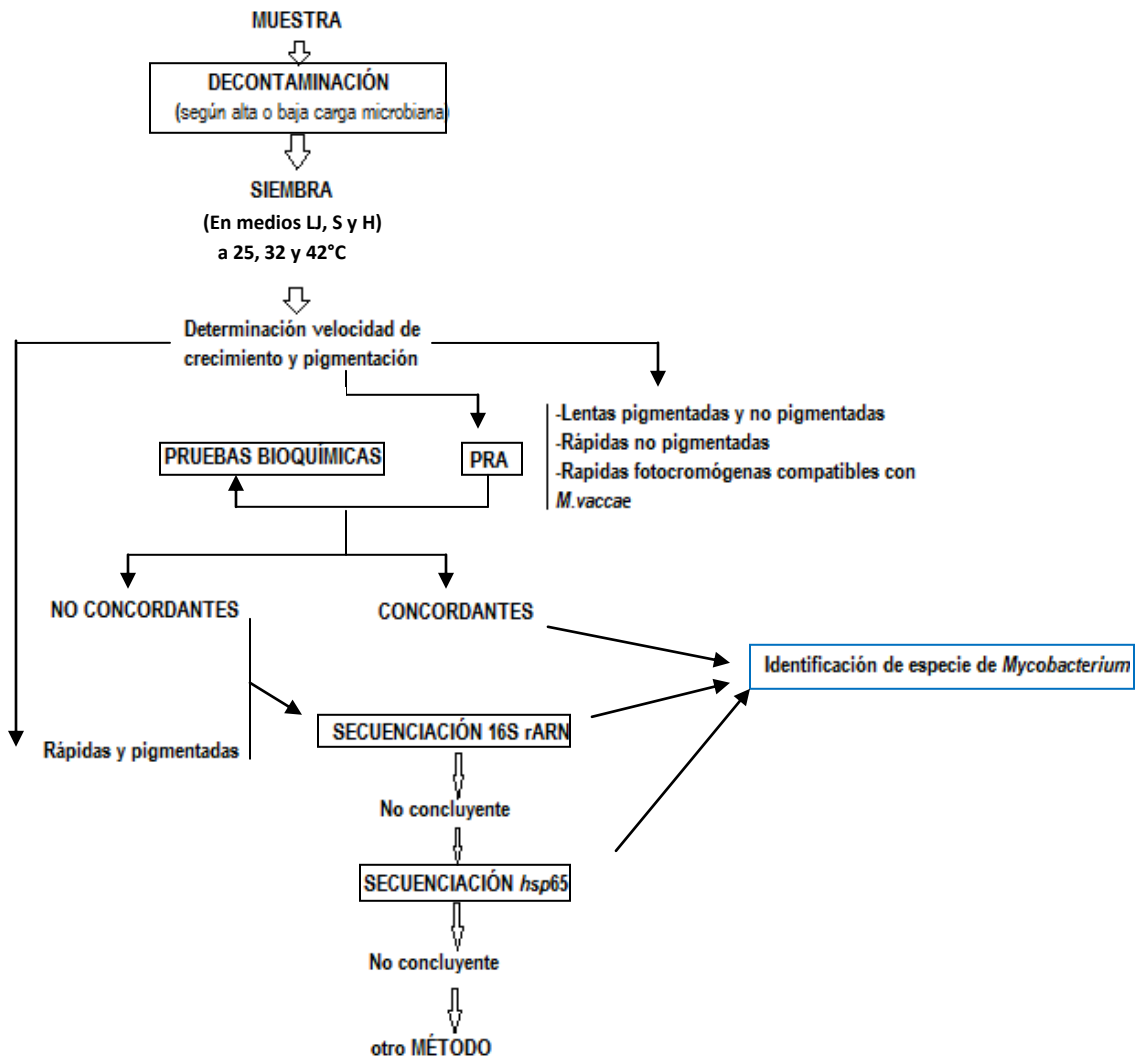


Figura 18: Esquema de identificación de MA para ser utilizado en el procesamiento de muestras ambientales.

(LJ: medio Löwenstein Jensen; S: Stonebrink; H: medio Herrold con micobactina)

ANEXO 2 - MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

MEDIO LÖWENSTEIN JENSEN

i) Medio basal

Polvo base comercial de LJ.....	37,3 g
agua destilada.....	600 mL
ii) Glicerina.....	12 mL
iii) Suspensión de huevos enteros.....	1.000 mL

Procedimiento:

Suspender 37,3 g del polvo en 600 mL de agua destilada. Calentar agitando continuamente y hervir 1 minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min. Enfriar a 50°C aproximadamente. Los huevos que deben ser frescos, se limpian con agua y detergente, se enjuagan con agua corriente y se dejan secar. Se desinfectan con alcohol 70°. Se van rompiendo uno a uno en el borde de un vaso de precipitado y se vuelca el contenido en otro vaso de precipitado apropiado para medir 1L. Con la licuadora se mezclan tratando de no formar exceso de burbujas. La suspensión resultante se vuelca en el frasco de 2L de capacidad que contiene la solución de medio base estéril. Agregar 12 ml de glicerina estéril. Se agita moviendo el frasco en forma circular. Se filtra el medio por un embudo estéril cubierto en gasa, con una goma en el extremo del caño de salida con pinza de Mhor. Se distribuye en tubos estériles con tapa a rosca (16x16 mm), flameando la boca de los mismos. Se debe trabajar siempre en condiciones de asepsia. Se colocan los tubos en el coagulador (horno a 85°C) de manera que queden picos de flauta desde el fondo hasta cerca de la boca del tubo. Los tubos deben permanecer en el coagulador alrededor de 30 min hasta su completa solidificación.

MEDIO STONEBRINK

i) Solución de sales:

Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄).....	3,5g
Fosfato disódico (Na ₂ HPO ₄ . 2H ₂ O).....	2,0 g
Piruvato de sodio.....	6,25g
Agua destilada c.s.p.....	500 mL
ii) Suspensión de huevos enteros.....	1.000 mL
iii) Solución acuosa de verde de malaquita al 2%.....	20 mL

Procedimiento

Preparar la solución de sales y esterilizar a 121°C durante 15 min. Dejar enfriar a temperatura ambiente. Los huevos que deben ser frescos, se limpian con agua y detergente, se enjuagan con agua corriente y se dejan secar. Se desinfectan con alcohol 70°. Se van rompiendo uno a uno en el borde de un vaso de precipitado y se vuelca el contenido en otro vaso de precipitado de 1L. Con la licuadora se mezclan tratando de no formar exceso de burbujas. La suspensión resultante se vuelca en el frasco de 2L de capacidad que contiene la solución salina estéril y se le agrega la solución de verde de malaquita. Se agita moviendo el frasco en forma circular. Se filtra por un embudo estéril cubierto en gasa, con una goma en el extremo del caño de salida con pinza de Mhor. Se distribuye en tubos estériles con tapa a rosca (16x16mm), flameando la boca de los mismos. Se debe trabajar siempre en

condiciones de asepsia. Se colocan los tubos en el coagulador (horno a 85°C) de manera que queden picos de flauta desde el fondo hasta cerca de la boca del tubo. Los tubos deben permanecer en el coagulador alrededor de 30 min.

MEDIO HERROLD CON MICOBACTINA

i) Medio basal

Peptona.....	9,0g
NaCl.....	4,5g
Agar.....	15,3g
Extracto de carne.....	2,7g
Glicerina.....	27 mL
Agua destilada.....	870 mL
NaOH 4%.....	4,1 mL aprox.

ii) Micobactina.....2 mg*

iii) Solución estéril de verde de malaquita 2% (en agua)..5,1 mL

iv) Yemas de huevo6

Procedimiento

Se calientan los componentes hasta disolver el agar. Agregar la glicerina y medir el pH. Esterilizar en autoclave 15 min a 121°C. Luego dejar que enfrie a 56°C agregar la micobactina y las yemas de huevo. Se filtra por un embudo estéril cubierto en gasa, con una goma en el extremo del caño de salida con pinza de Mhor. Se distribuye en tubos estériles con tapa a rosca (16x16mm), flameando la boca de los mismos. Se debe trabajar siempre en condiciones de asepsia. Se colocan los tubos en el coagulador (horno a 85°C) de manera que queden picos de flauta desde el fondo hasta cerca de la boca del tubo y se apaga el mismo. Se dejan unos 10 minutos y se dejan enfriar.

*La micobactina comercial se resuspende en el volumen adecuado de etanol. Se agrega la cantidad suficiente al medio para obtener una concentración final de 2mg/L.

SOLUCIONES DE USO

Solución TAE 50X

Trisma base.....	242g
Acido acético.....	57,1mL
EDTA.....	37,2g
Volumen final (agua bidestilada).....	1.000 mL

Solución TAE 1X

Solución TAE 50 X.....	20 mL
Volumen final (agua bidestilada)...	1.000mL

ANEXO 3 - PRUEBAS BIOQUÍMICAS

A. Características del cultivo

- **Tiempo de desarrollo**

- **Temperatura óptima de desarrollo**

- **Aspecto de la colonia**

Medios de cultivo:

Se utiliza los medios Löwenstein Jensen (LJ) y Stonebrink (S). También puede usarse Middlebrook 7H10 o 7H11.

Procedimiento:

Preparar una suspensión madre bacilar del cultivo que se va a estudiar, se compara la turbidez de una suspensión McFarland 0,5. Se realiza una dilución 10^{-2} ó 10^{-3} de esa suspensión madre, con el fin de obtener colonias bien separadas en el cultivo, se siembran 0,2 mL en tubos de LJ y tubos de S los cuales se incuban de la forma siguiente:

2 LJ a 20-25°C

3 LJ y 1 S a 37°C

3 LJ a 30°C

2 LJ y 2S a 42°C

Dos tubos de LJ incubados a 37°C y 2 incubados a 30°C se envuelven en papel negro o de aluminio. Se controla la aparición de desarrollo y las temperaturas en las que hubo crecimiento y la presencia o no de pigmentos.

B. Prueba de fotocromogenicidad:

Medios de cultivo:

Se utiliza los medios Löwenstein Jensen (LJ) y Stonebrink (S).

Procedimiento e interpretación:

En lo que respecta a la presencia de pigmento, dos son los resultados posibles:

a) Se observa la presencia de pigmento tanto en los tubos cubiertos como en los no cubiertos (**escotocromogenicidad**).

b) Si no se observa pigmentos en ninguno de ellos se debe efectuar la prueba de fotocromogenicidad que consiste en destapar uno de los tubos y colocarlo expuesto a la luz natural directa (o lámpara fluorescente a 40 cm) durante 48hs. Luego de este periodo se destapa el tubo restante y se compara su color con el expuesto a la luz. De observarse en este último la presencia de pigmento, se considera a la cepa **fotocromógena**. Esta prueba no es válida si el cultivo tiene más de 3 semanas.

C. Reducción de nitratos

Preparación de medios y reactivos:

-Se prepara una solución de NaNO_3 0,01M en buffer fosfato 0,022M, pH=7, de la siguiente forma:

Solución 1:

KH_2PO_43,02 g

Agua destilada.....1.000 mL

Solución 2:

Na₂HPO₄.....3,16 g
Agua destilada.....1.000mL

Solución 3:

Agregar 611 mL de la solución 2 a 389 mL de la solución 1, llevar a pH=7.

Solución de sustrato de nitrato de sodio en buffer:

NaNO₃.....0,85 g
Solución 3.....1.000 mL

Distribuir en alícuotas de 100mL y esterilizar en autoclave a 121°C 15 minutos.

-Solución de ácido clorhídrico:

Acido clorhídrico concentrado.....10 mL
Agua destilada.....10 mL

Agregar lentamente el acido al agua destilada, nunca a la inversa. Mantener en un frasco color ámbar, en oscuridad en heladera.

-Solución de sulfanilamida 0,2%:

Sulfanilamida0,2%
Agua destilada.....100 mL

Mantener en un frasco color ámbar en oscuridad y en heladera.

-Solución de N-naftiletildiamina 0,1%:

N-naftiletildiamina.....0,1g
Agua destilada.....100 mL

Conservar la solución en frasco color ámbar en oscuridad y en heladera.

Procedimiento

Colocar 2 mL de solución de nitrato de sodio 0,01M en solución buffer de fosfato, en tubos estériles de 16 mm x 125 mm con tapa rosca, a los que se introduce con ansa aproximadamente 10 mg de masa bacilar de un cultivo de menos de 1 mes, tratando de homogeneizar la mezcla. Se incuba la suspensión 2 horas a 37 °C. Al cabo de ese tiempo, acidificar con una gota de solución de ácido clorhídrico (dilución 1:1 en agua). Agregar 2 gotas de solución de sulfanilamida 0,2% y 2 gotas de solución de N-naftiletildiamina 0,1%.

Interpretación

El desarrollo de color se produce entre 30 a 60 segundos. Sólo son considerados positivos 3+(rojo) y 5+(púrpura) de la escala. Si no se produce color se confirma el resultado como negativo por el agregado de pequeña cantidad de polvo de zinc. Si el color rojo desarrolla después del agregado de zinc, significa que el nitrato está todavía presente y es catalizado por el zinc con formación del color, por lo cual la reacción es verdaderamente negativa. Si el color no se produce después del agregado de zinc, repetir la técnica para confirmar la reacción. La prueba se realiza con un control positivo: (*M. fortuitum*) y negativo (tubo sin inóculo bacteriano).

El método no es altamente reproducible entre laboratorios y es conveniente utilizar una escala de color estándar.

El problema entre las divergencias del método se ha producido con *M. szulgai*, sobre el cual algunos informes lo han reportado nitrato reductasa negativo.

Rosado pálido: +/-

Rosado claro: 1+

Rosado intenso: 2+

Rojo: 3+

Rojo intenso: 4+

Rojo púrpura: 5+

Solamente son considerados positivos: 3+ a 5+.

Estándar de reducción de nitrato

Solución concentrada:

Solución a: fosfato disódico 0,067M

Na₂HPO₄ anhidro.....9,47g

Agua destilada.....1000 mL

Solución b: fosfato monopotásico 0,067M

KH₂PO₄.....9,07g

Agua destilada.....1000mL

Solución c: Fosfato trisódico 0,067M

Na₃PO₄. 2H₂O.....25,47g

Agua destilada.....1.000 mL

Solución d: fenolftaleína 1% (1g en 100 mL de alcohol etílico)

Solución e: Azul de bromotimol 1% (1g en 100 mL de alcohol etílico)

Solución f: Azul de bromotimol 0,01%: preparar mezclando 1 mL de la solución e) en 100 mL de agua destilada.

Solución de trabajo:

Mezclar 35 mL de la solución concentrada a), 1,5 mL de la solución concentrada b) y 100 mL de la solución concentrada c).

Procedimiento:

Colocar ocho tubos limpios en una gradilla, numerarlos de 1 a 8, usar el mismo tamaño de tubos que para la prueba de reducción de nitrato.

Colocar 2 mL del buffer solución de trabajo en los tubos 2 a 8.

En 10 mL del buffer solución de trabajo, agregar 0,1 ml de solución d) y 0,2 ml de solución f). Esto constituye la solución g.

Colocar 2 mL de la solución g) en el tubo número 1 que corresponde a 5+ del estándar de color.

Al tubo 2, agregar 2 mL de la solución g), mezclar bien y transferir 2 mL al tubo siguiente número 3, proseguir con la serie de diluciones por el agregado de 2 mL, en todos los tubos descartando 2mL del último tubo. Autoclavar los tubos, sellar y mantener a 5°C.

Estandar de color

Tubo 1: 5+

Tubo 2: 4+

Tubo 3: 3+

Tubo 5: 2+

Tubo 6: 1+

Tubo 8: +/-

D. Actividad de catalasa

Se puede realizar por tres técnicas:

- 1- La catalasa semicuantitativa, indica el nivel de producción de la enzima.
- 2- Pérdida de la actividad a 68 °C.
3. Método a temperatura ambiente o de la gota. (Se realiza en ocasiones para una determinación cualitativa rápida de catalasa).

La reacción en las micobacterias difiere de la utilizada en otros tipos de bacterias, por el empleo de peróxido de hidrógeno al 30 % y una solución concentrada de detergente: Tween 80 al 10 %, el cual ayuda a dispersar la masa bacteriana hidrofóbica, hasta bacilos separados individualmente, maximizando la determinación de la enzima.

Catalasa semicuantitativa (SC)

Medios y Reactivos

Agua oxigenada 110 volúmenes (solución de peróxido de hidrógeno al 30 %). Debe conservarse en heladera. No usar H₂O₂ al 3% comercializado en farmacias.

Solución acuosa de Tween 80 al 10 %. Disolver 10 mL de Tween 80 en 90 ml de agua destilada, mezclar y autoclavar 10 minutos a 121°C. En el momento de usar calentar ligeramente para obtener una mejor disolución, mantener en heladera.

Procedimiento

Distribuir 5 mL de medio de Löwestein-Jensen en tubos estériles de 18 x 150 mm con tapa a rosca. Coagular el medio con los tubos en posición vertical, lo cual puede efectuarse colocando los tubos en un baño de agua termorregulado a 85 °C, durante 40 minutos.

Inocular la superficie del medio con 0,1 mL de la suspensión bacilar en agua destilada incubar 2 semanas a 32 °C. Observar al cabo de ese tiempo que exista un buen desarrollo bacteriano.

Mezclar partes iguales de peróxido de hidrógeno y solución de Tween 80. Mezclar inmediatamente antes de su uso calculando la utilización de 0,5 mL de solución por cada cepa. Mantener a temperatura ambiente.

Agregar 1.0 mL de la mezcla de soluciones Tween-peróxido de hidrógeno al tubo de cultivo.

Dejar el tubo en posición vertical durante 5 minutos.

Interpretación

Medir en milímetros la altura de la columna de burbujas sobre la superficie del medio.

Menor de 31 mm: negativa ó muy débil.

Entre 31 y 45 mm: resultado no concluyente.

Más de 45 mm: catalasa francamente positiva.

Catalasa cualitativa a 68 °C

Reactivos

Las soluciones de peróxido de hidrógeno y Tween descritas para la prueba semicuantitativa.

Solución reguladora de fosfatos M/15, pH 7: mezclar 61,1 mL de una solución de fosfato disódico M/15 (9,47 g de Na₂HPO₄ en 1.000 mL de agua) con 38,9 mL de una solución de

fosfato monopotásico M/15 (9,07 g de $K H_2PO_4$ en 1.000 mL de agua). Autoclavar a 121°C 15 minutos.

Procedimiento

Distribuir la solución reguladora, 0,5 mL, en tubos de 12 x 100 mm. Agregar en cada uno de ellos el contenido de un ansa cargada de colonias tomada de un cultivo joven en medio a base de huevo. Colocarlos en baño de agua termorregulado a 68 °C durante 20 min. Retirar y dejar enfriar a temperatura ambiente. Agregar a los tubos 0,5 mL de una mezcla con partes iguales de la solución de Tween y peróxido de hidrógeno.

Interpretación

Observar la formación de burbujas en la superficie. Esperar 20 minutos antes de informar el resultado negativo: no se han producido burbujas.

Controles

M. terrae, *M. avium*: positivo.

M. tuberculosis: negativo.

E. Hidrólisis de Tween 80

Medios y Reactivos

El Tween 80 es la marca registrada del detergente: monoleato de polioxietileno sorbitan.

Solución de rojo neutro:

Rojo neutro..... 100 mg

Agua destilada..... 100 mL

Sustrato: Solución reguladora de buffer fosfato M/15, pH7, Tween 80 y rojo neutro.

Mezclar 61,1 mL de una solución de fosfato disódico M/15 (9,47 g de Na_2HPO_4 en 1.000 mL de agua) con 38,9 mL de una solución de fosfato monopotásico M/15 (9,07 g de $K H_2PO_4$ en 1.000 mL de agua). A 50 mL de buffer fosfato agregar 0,25 mL de Tween 80 y 1mL de solución de rojo neutro. Controlar el pH que no debe ser menor a 7 y el color amarillo ambar. Distribuir en tubos con tapa rosca (4 mL cada uno). Autoclavar a 121°C 15 minutos.

Conservar en refrigeración y sin contacto con la luz, no más de dos semanas.

Procedimiento

Suspender en el sustrato colonias de un cultivo joven en medio sólido (aproximadamente, el contenido de un ansa de 3 mm de diámetro). Incubar a 32 °C, sin contacto con la luz. Examinar a los 5 y a los 10 días. Incubar un tubo control sin inóculo.

Interpretación

Observar los tubos, comparativamente con el control de color ámbar. Se considera positivo un cambio de color a rosa salmón. Tomar nota de la fecha en que observa ese cambio de color y seguir incubando hasta completar los 10 días para confirmar; el color puede intensificarse a rosado más intenso y hasta rojo pajizo. Los tubos no deben ser agitados antes de la lectura. Algunas células pueden tomar el colorante, lo que provoca un color rosado en el sedimento del tubo, mientras que el sobrenadante continua ámbar; en estos casos el informe es negativo.

Controles

- *M. kansasii*: rápido, positivo.

- *M. gordonae*: lento, positivo.

- *M. scrofulaceum*: negativo.

F. Prueba de la pirazinamidasa

Medio de cultivo

Caldo base deshidratado de Dubos comercial.....6,5g
Pirazinamida.....100mg
Piruvato de sodio.....2g
Agua destilada.....1.000 mL

Calentar la mezcla hasta fundir el agar, distribuir 5 mL en tubos con tapa a rosca de 16x125mm, esterilizar a 121°C 15 minutos, dejar solidificar en posición vertical.

Solución de sulfato ferroso amoniacal

Sulfato ferroso amoniacal 1g, agua destilada 100 mL.

Procedimiento

Cultivar 5 a 10 mg de la masa bacteriana proveniente de un desarrollo joven en medio Löwestein-Jensen en el medio de agar preparado para el método, incubar a 32°C durante 4 días. Agregar a cada tubo 1 mL de la solución de sulfato ferroso amoniacal 1% y colocar los tubos en el refrigerador. Luego de 4 horas se examina la presencia de una banda rosada de difusión de la sal ferrosa.

Interpretación

La banda rosa en la interfase indica la hidrólisis de la pirazinamida con formación de ácido pirazinoico.

G. Método de la arilsulfatasa

Medios y reactivos

Solución de Sustrato 0,08M:

Fenofaleína disulfato tripotásico.....2,6 g
Agua destilada.....50 mL
Esterilizar por filtración. Mantener refrigerado.

Medio

Preparar dos frascos con 90 mL de medio líquido de Dubos, esterilizar a 121°C 15 minutos. Agregar 10 mL de OADC en condiciones de esterilidad a cada uno. Adicionar al medio 1,25 mL de la solución del sustrato para la prueba de 3 días y 3,75 mL para la prueba de 2 semanas. Distribuir asépticamente en tubos de 16x125 mm con tapa rosca, a razón de 2 mL por tubo.

Reactivo: carbonato de sodio 2N

Na₂CO₃ anhidro.....10,6 g
Agua destilada.....100 mL
Esterilizar por filtración.

Procedimiento

Para cada cepa colocar 0,1 mL de una suspensión bacilar concentrada de bacterias tomadas de colonias de un cultivo joven. Incubar a 37°C. A los 3 días agregar al tubo

correspondiente 6 gotas de la solución de Na_2CO_3 . A las 2 semanas proceder en forma idéntica en el tubo restante. Colocar un tubo control con sustrato y sin inóculo.

Interpretación

La aparición de una coloración rosada en la parte superior del medio señala resultado positivo indicando la liberación de fenolftaleína libre.

Cuando el sustrato tiene fenolftaleína libre el tubo control no inoculado puede desarrollar color rojo al agregarle el reactivo.

H. Toma de hierro

Reactivo

Citrato de hierro amoniacal.....4g

Agua destilada.....100 mL

Procedimiento

Inocular 2 tubos de medio Löwenstein Jensen, cada uno con 0,1 mL de una suspensión bacilar de aproximadamente 1mg/mL de la cepa. Colocar los tubos inclinados difundiendo la siembra en toda la superficie del medio. Luego en posición vertical añadir en el fondo de uno de ellos 1 ml de la solución de citrato de hierro amoniacal. En el otro tubo agregar 1 mL de agua destilada estéril. Incubar en posición vertical a 32°C.

Interpretación

De ser la reacción positiva aparece en el tubo con citrato, entre la primera y la tercera semana de incubación, un color marrón que se va extendiendo a las colonias por encima del nivel del líquido. Se compara con el tubo control.

I. Crecimiento en NaCl 5%

Medio

Se prepara un lote de medio Löwenstein Jensen con una concentración final de NaCl al 5%. Asegurarse que la mezcla quede homogénea.

Procedimiento

Inocular una concentración bacilar aproximada a 1mg/mL en agua destilada a dos tubos de Löwenstein Jensen, uno con NaCl y otro sin agregado. Incubar a 32°C y examinar una vez por semana durante 28 días.

Interpretación

En el tubo control normalmente se obtendrá colonias incontables. Si, en esas condiciones, en el tubo con NaCl se observa desarrollo de más de 50 colonias, se considera que la cepa es resistente o tolerante al NaCl. Si el desarrollo es menor a 50 colonias se considerará sensible.

Controles:

M.smegmatis: crecimiento en ambos tubos.

M.avium: sensible solamente en el tubo control.

J. Reducción de telurito

Medio

Preparar medio Middlebrook 7H9 y suplementar con 0,5 mL de Tween 80 por cada 100 mL de medio. Distribuir en volúmenes de 180 mL y esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C. A cada 180 mL de medio estéril mantenido a 50-55°C suplementar con 20 mL de OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) adquirido comercialmente o preparado como sigue.

Preparación de OADC:

Solución de dextrosa al 50%: disolver 50 g de dextrosa en 99 mL de agua destilada. Se agrega 1 mL de solución de ácido cítrico al 10%. Autoclavar 10 minutos a 121°C.

Complejo albúmina-ácido oleico:

Disolver 0,12 mL de ácido oleico en 20 mL de NaOH 0,05N.

Preparar una solución de albúmina bovina al 5%, mezclando 95 mL de NaCl al 0,85% y 5 g de la fracción V albúmina.

Agregar 5 mL de la solución de ácido oleico a 95 mL de solución de albúmina al 5%, ajustar el pH a 6,8. Esterilizar por filtración. Repartir en recipientes esterilizados e incubarlos a 37°C durante una noche.

Colocar a baño maría a 56°C durante 30 minutos y conservar a 4°C.

A 50 mL de complejo albúmina-oleico se le agrega 0,8 mL de dextrosa al 50%, y 0,4 mL de catalasa 1.000 mg/mL.

Solución de telurito de potasio al 0,2%:

Telurito de potasio 0,1g en 500 mL de agua destilada. Colocar 2 mL en pequeños tubos o en viales y autoclavar (10 min 121°C). Conservar a 4°C.

Procedimiento

Colocar 2 mL de medio en tubos estériles con tapa a rosca. Inocular 2 tubos con una gota de suspensión bacteriana. Incubar a 32°C por 7 días (agitar para mejorar el crecimiento). Agregar 2 gotas de la solución de telurito 0,2% y agitar. Re-incubar a 35-37°C (no agitar los tubos durante esta re-incubación). Observar luego de 3 días. Si a los 3 días la prueba es negativa, descartar este tubo y observar el segundo tubo re-incubado por 9 días.

Interpretación

Formación de un precipitado negro metálico: positivo

No hay formación de precipitado negro: negativo.

Tubo control sin inóculo: negativo.

Algunas especies producen precipitado marrón o gris, esto debe considerarse como negativo. No agitar los tubos. Observar la coloración de la masa bacilar depositada en el fondo.

Controles

Complejo *M. avium-intracellulare*: positivo.

Complejo *M. terrae*: negativo.

K. Metodo de la ureasa

Medio de cultivo

Peptona.....1g
Dextrosa.....1g
NaCl.....5g
PO₄H₂K.....2g
Urea.....20g
Rojo fenol.....0,012g
Agua destilada....100 mL

Realizar la mezcla de los componentes y esterilizar por filtración.

Diluir 1:10 con agua destilada estéril y distribuir en tubos de 13x100 mm con tapa a rosca en forma aséptica. Mantener en oscuridad y refrigeración.

Procedimiento

Con el ansa agregar al tubo colonias de un cultivo joven proveniente de medio con huevo. No arrastrar medio de cultivo. Incubar 3 días a 32°C.

Interpretación

La aparición de color rosa se interpreta como resultado positivo.

Controles

M. avium: negativo.

M. scrofulaceum, *M. kansasii*: positivo.

L. Prueba de la β-galactosidasa

Medios y reactivos

Reactivo ONPG

Pesar 10 mg del sustrato 2-nitrofenil β-D-galactopiranosido en 10 mL de agua destilada. Esterilizar por filtración. Observar que la preparación no se oxide o sea permanezca transparente.

Procedimiento

Se inocula una suspensión bacilar en 0,25 mL de agua a partir de un cultivo joven en Löwenstein-Jensen. Se coloca una gota de tolueno y se incuba 10 minutos en estufa a 37°C. Luego se agrega 0,25 mL del sustrato ONPG. Incubar a 37°C durante 24 hs.

Interpretación

La aparición de color amarillo indica positivo debido a la hidrólisis enzimática del sustrato con liberación de nitrofenol.

Controles

M. chelonae: control positivo.

M. bovis: control negativo.

M. Hidroxilamina

Medio

Pesar 0,5 g de hidroxilamina (HA) y diluir en 10 mL de agua destilada estéril. Agregar 1 mL de la solución a 100 mL de medio base de Löwenstein-Jensen. Distribuir 2 mL en tubos de 12x120 mm, coagular en pico de flauta durante 50 minutos a 85°C. La concentración final de HA es de 500µL/mL

Procedimiento

Inocular una gota de suspensión bacteriana. Incubar a 32°C durante 2-3 semanas.

Controles

M. fortuitum: resistente.

M. flavescens: sensible.

N. Utilización de Citrato, manitol e inositol

Medio de cultivo

(NH ₄)SO ₄	2,4g
KH ₂ PO ₄	0,5g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,5g
Agar (2%).....	20g
Agua destilada.....	950mL
Citrato de sodio.....	5,6g
Manitol.....	5.0g
Inositol.....	5,0g

Procedimiento

Disolver en agua destilada todos los reactivos excepto, citrato de sodio, manitol e inositol. Ajustar el pH a 7, con NaOH 10% ó CIH 10%, autoclavar durante 20 min a 121°C.

Medio con Citrato.

Enfriar a 56°C en baño de agua, disolver 5,6 g de citrato de sodio en 50 mL de agua destilada, esterilizar por filtración. Agregar acépticamente esta solución al medio basal y distribuir 8 mL por tubo y solidificar en pico de flauta.

Medio con Manitol o Inositol

Enfriar a 56°C en baño de agua, disolver 5 g de manitol o inositol en 50 mL de agua destilada, esterilizar por filtración. Agregar asépticamente esta solución al medio basal y distribuir 8 mL por tubo y solidificar en pico de flauta.

Preparar una suspensión a partir de un cultivo en LJ, hacer diluciones en base 10 en solución salina estéril hasta no observar turbidez. De la última dilución inocular 0,1 mL en cada tubo con los medios suplementados. Colocar un tubo control, sin inocular, por cada medio. Incubar a 32°C y observar a los 14 días.

Controles

M. smegmatis: desarrolla en los tres medios.

M. fortuitum: no desarrolla en los tres medios.

ANEXO 4 - ILUSTRACIONES

Pruebas bioquímicas para identificar micobacterias



Foto A: prueba de nitrato

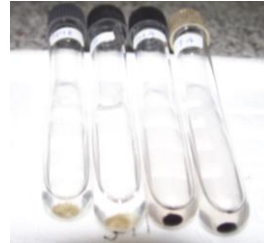


Foto B: prueba de reducción de telurito



Foto C: prueba de toma de hierro

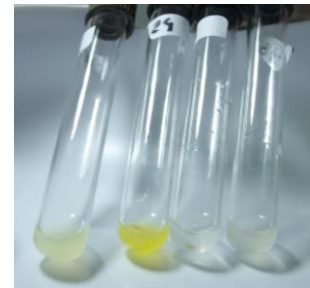


Foto D: prueba de β galactosidasa

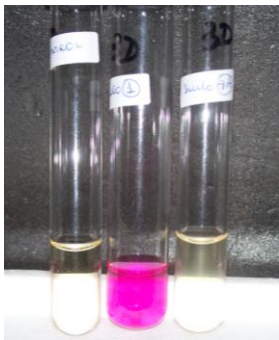


Foto E: prueba de arilsulfatasa

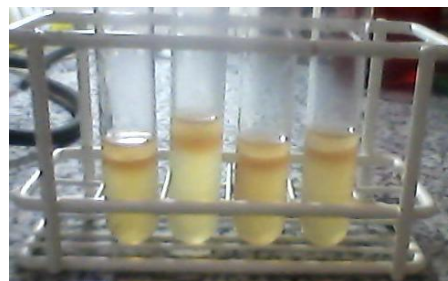


Foto F: prueba de pirazinamidasa

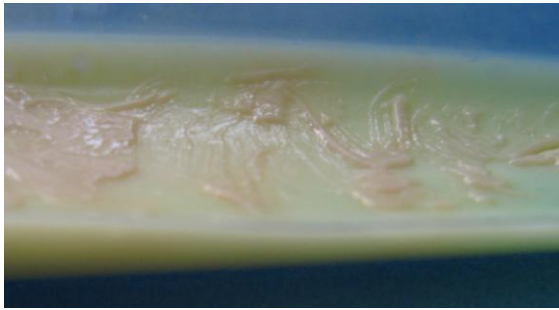


Foto G: prueba de hidrólisis del Tween 80

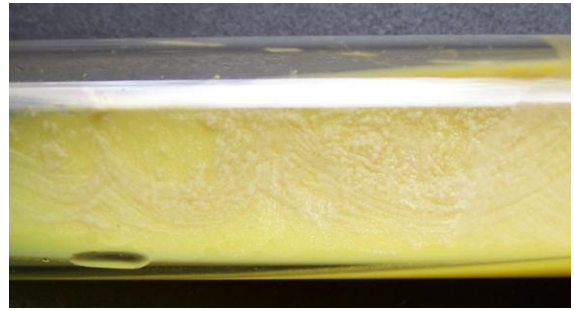


Foto H: prueba de catalasa semicuantitativa

COLONIAS DE MICOBACTERIAS



M. fortuitum (1) aislado de agua de red



M. florentinum/lentiflavum (6) aislado de agua de red



M. poriferae (28) aislado de humedal



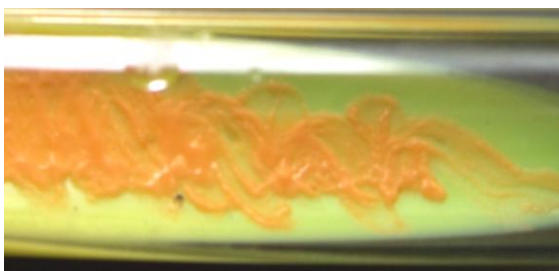
M. vaccae (30) aislado de humedal



M. vaccae (47A) aislado de humedal



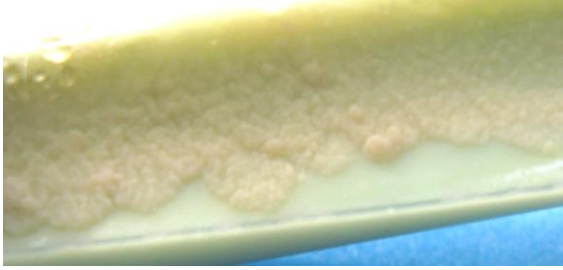
M. vaccae (48C) aislado de humedal



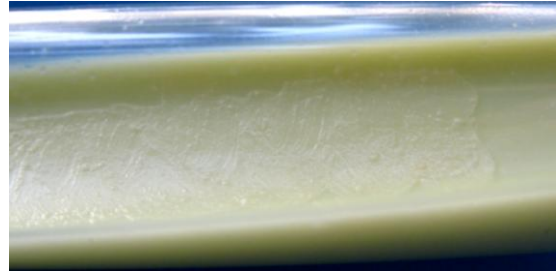
M. duvalii (53A) aislado de humedal



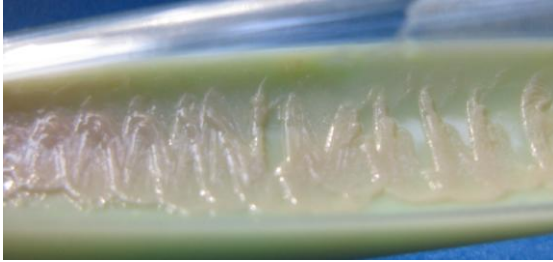
M. aurum (53B) aislado de humedal



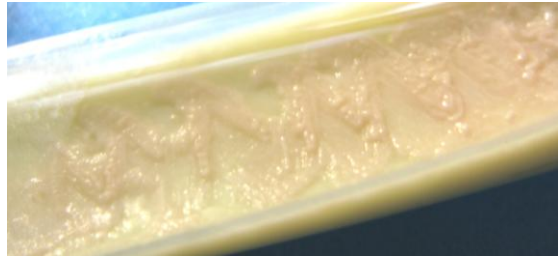
M.porcinum (71) aislado de agua de red



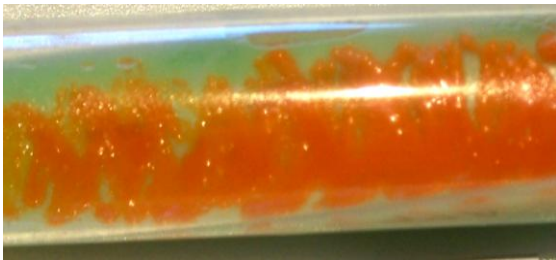
M.nonchromogenicum (73) aislado de agua de red



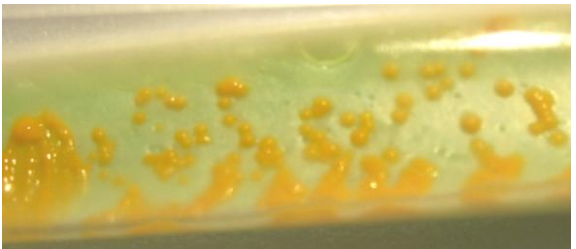
M.fortuitum (74) aislado de agua de red



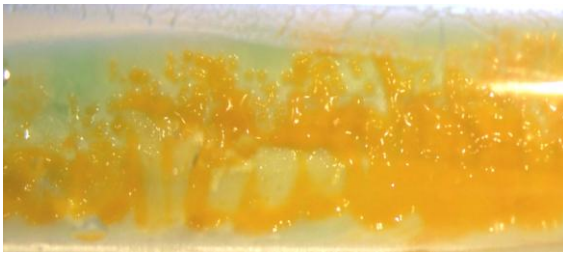
M.nonchromogenicum (76) aislado de agua de red



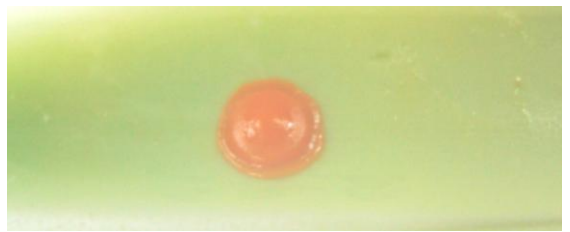
M.aurum (77A) aislado de humedal



Mycobacterium sp. (78A) aislado de humedal



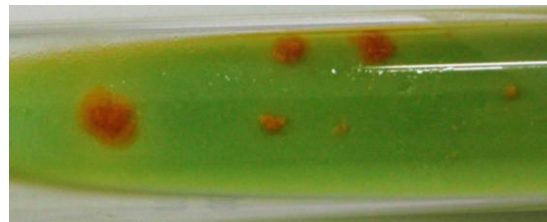
M.vaccae (79A) aislado de humedal



M.aurum (52B) aislado de humedal



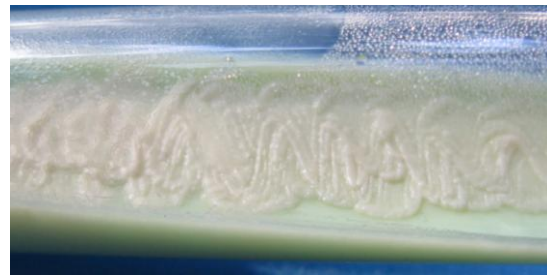
M.vaccae (29A) aislado de humedal



Mycobacterium sp. (29B) aislado de humedal



M.peregrinum (89A) aislado de fuente arquitectónica



M.peregrinum (87A) aislado de fuente arquitectónica



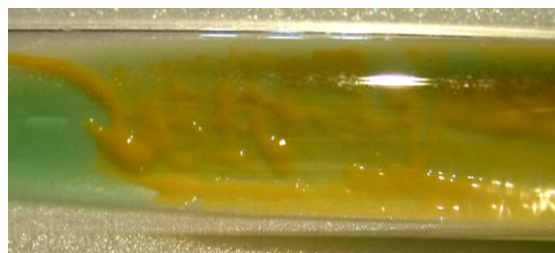
M.arupense (88B) aislado de fuente arquitectónica



M.asiaticum (88D) aislado de fuente arquitectónica



M. fortuitum (90B) aislado de fuente arquitectónica



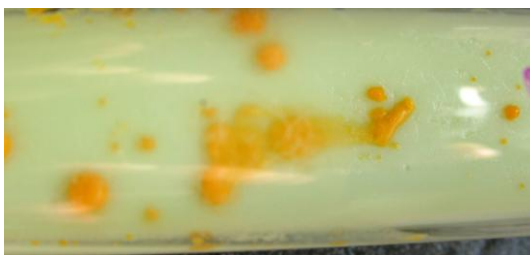
Mycobacterium sp (80C) aislado de humedal



Mycobacterium sp. (78G) aislado de humedal



M. aurum (77A) y *Mycobacterium* sp (77C) aislados de humedal



M.gordonae (34) aislado agua de red



Mycobacterium sp. (86) aislado de humedal