

**Identificación de Micobacterias No
Tuberculosas (MNT) aisladas de Sistemas
de Distribución de Agua Potable (SDAP) de
la Universidad Quindío mediante el uso de
métodos convencionales y moleculares**



Universidad del Quindío

Facultad de Educación

Programa de Licenciatura y Educación Ambiental

Armenia - Quindío

2006

FRANCY LORENA BUITRAGO PORTILLO SANDRA MILENA RAMÍREZ HERRERA

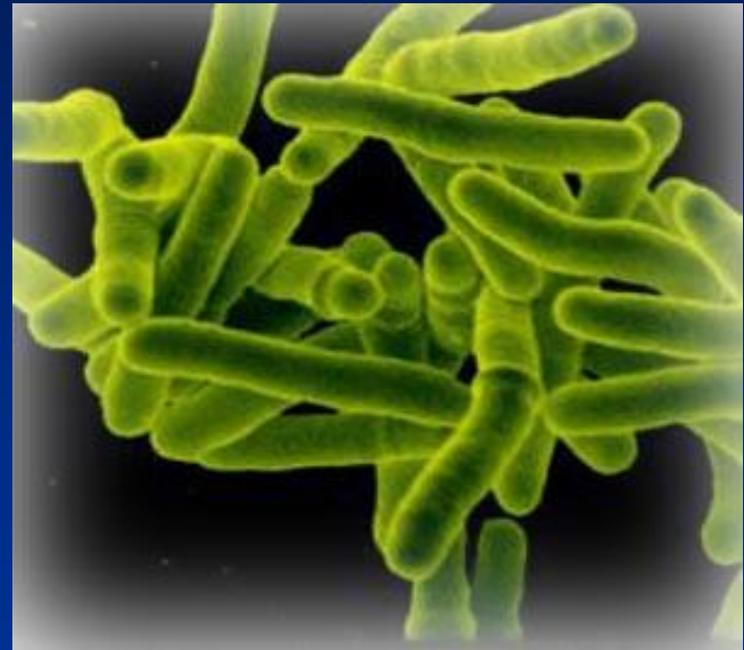
Director:
Arley Gómez López MD, Msc, PhD



Grupo de Investigación en
Patogénesis Molecular
Centro de Investigaciones Biomédicas
Universidad del Quindío

EL GENERO *Mycobacterium*

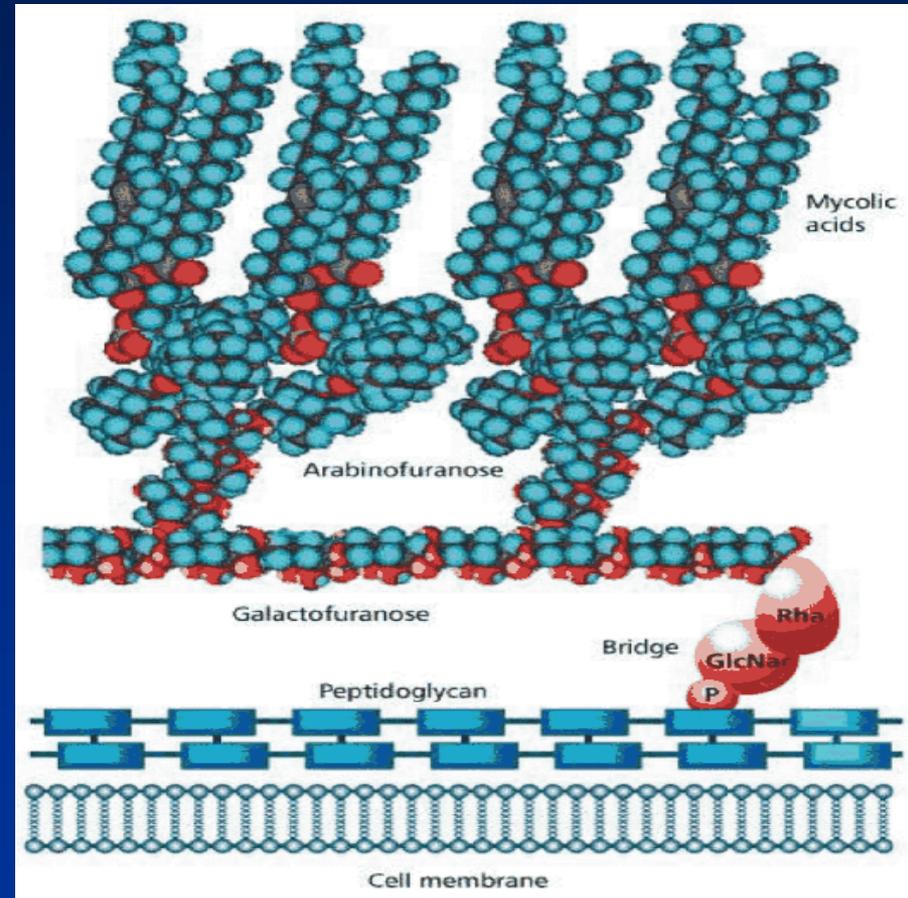
- Bacilos aeróbios estrictos
- No esporulados
- No encapsulados
- Inmóviles
- Ligeramente curvos o rectos
- 1- μm de diametro y 10 μm de long
- Acido alcohol Resistentes (BAAR)
- ADN: G+C (61-71%)



www.microscopyconsulting.com/Gallery/images/M

EL GENERO *Mycobacterium*

- Aproximadamente 60% del peso seco de la micobacteria
- Consta de cuatro 4 capas lo que confiere resistencia a detergentes y disminuye la permeabilidad a antimicrobianos



EL GENERO *Mycobacterium*

Comprende 100 especies descritas

- Complejo *M. tuberculosis*
- Micobacterias No Tuberculosas (MNT)
M. avium, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. xenopi*, *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*
- *Mycobacterium leprae* (No cultivable)

CARACTERÍSTICAS DE LAS MNT

- Tiempo de crecimiento: Rápido crecimiento (7 días) y lento crecimiento (2 a 8 semanas)
- Pigmentos : Luz
Oscuridad
- Temperatura de crecimiento en **cultivo** de 32 a 42 °C

CLASIFICACIÓN

- Runyon (1959) MNT
 - Grupo I : Fotocromogénicas
 - Grupo II : Escotocromogénicas
 - Grupo III : No cromogénicas
 - Grupo IV : Crecimiento

¿DÓNDE SE PUEDEN ENCONTRAR LAS MNT?

- Polvo
- Suelo
- Leche
- Alimentos
- Aerosoles
- **Agua**



PRUEBAS DE CALIDAD DE AGUA

- Contemplan por legislación análisis Microbiológicos.
- Las MNT no son incluidas a pesar de su carácter oportunista
- Directiva de la Comunidad Europea 93/83 EC del consejo 3 Nov/1998

ESPECIES DE MNT POTENCIALMENTE PATÓGENAS Y REPORTADAS EN SDAP

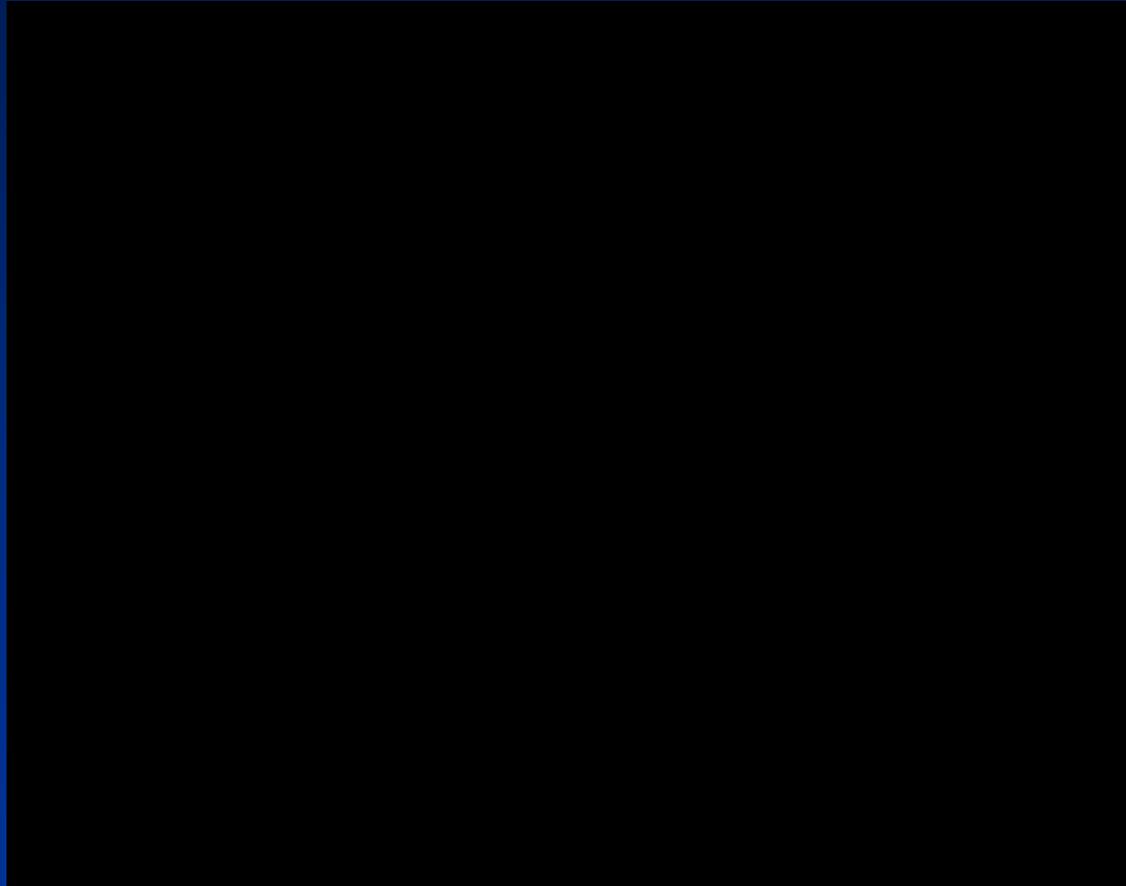
Especie	Enfermedad
<i>M. fortuitum</i>	Infección cutánea
<i>M. Kansasii</i>	Infección pulmonar Osteomelitis
<i>M. chelonae</i>	Infección cutánea Infecciones diseminadas, de tejido blando y pulmonares.
<i>M. avium</i>	Linfadenitis, infección pulmonar y diseminada.

MECANISMOS DE PERSISTENCIA DE LAS MNT EN LOS SDAP



- **Rutas de entrada en los SDAP:**
 - Brechas de tratamiento de agua
 - Tubos de escape
 - Válvulas
 - Uniones entre tubos
 - Tanques de almacenaje de agua tratada
- **Factores de supervivencia:**
 - Crecimiento en concentraciones nutritivas bajas
 - Asociación a las biopelículas
 - Interacción con protozoos

FORMACIÓN DE UNA BIOPELÍCULA (BIOFILMS)



MNT REPORTADAS EN SDAP:

A nivel mundial

AUTOR	FECHA	ESTUDIO	REPORTE
Vaerewijck y col	2005	Micobacterias en sistemas de distribución de agua potable	Se encontró: <i>Mycobacterium avium</i> , <i>Mycobacterium Kansasii</i> , y <i>Mycobacterium xenopi</i>
Le Dantec y col	2002	Presencia de micobacterias en líneas de tratamiento y sistemas de distribución de agua	41,3% de Micobacterias saprofitas 16,3% potencialmente patógenas 54,8% no identificadas
Covert y col	1999	Presencia de micobacterias no tuberculosas en muestras ambientales	En maquinas de hielo de hospital se ha aislado <i>M. fortuitum</i> y <i>M. gordonae</i>
Chang y col	2002	Identificación de micobacterias no tuberculosas en grifos de agua por PCR-PRA	Presencia de MNT en el agua de hospitales, por lo cual se han asociado a brotes nosocomiales

En Colombia:

Muñoz y col	1953	Micobacteriaceas del medio ambiente colombiano	Presencia de Micobacterias en diferentes fuentes: en aguas negras, en polvo y en algas verdes
Serna y col	1987	Presencia de micobacterias atípicas en peces ornamentales	Aislaron MNT en 100% de las muestras de agua y en 34.8% de las muestras de peces ornamentales.
Agudelo y col	1998	Incidencia de micobacterias atípicas en aguas de abastecimiento humano en centros educativos al sur occidente de Santa fé de Bogotá.	Aislaron <i>Mycobacterium avium intracellulare</i> , <i>Mycobacterium chelonae</i> y <i>Mycobacterium gordonae</i> .

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

- Debido a que la reglamentación no contempla el análisis de micobacterias en el agua y que su identificación no se ha tenido en cuenta:
 - No se ha reportado en los SDAP de muchos países entre ellos Colombia
 - No se conoce si las enfermedades por MNT están asociadas a la contaminación del agua
 - Hace falta claridad en su significancia clínica

JUSTIFICACIÓN

Es necesario hacer los estudios de aislamiento e identificación de MNT en los SDAP por medio de técnicas estándares puesto que:

- En poblaciones inmunocomprometidas las enfermedades producidas por MNT representan un problema de salud importante y su presencia en los SDAP aumentaría el riesgo de infección

OBJETIVOS

- **GENERAL**

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

- **ESPECÍFICOS:**

- ✓ Analizar la presencia de MNT potencialmente patógenas en las fuentes hídricas de la universidad y sus posibles efectos en la salud de la comunidad universitaria
- ✓ Identificar por pruebas bioquímicas y PRA los aislados positivos para BAAR de grifos y SDAP de la universidad del Quindío

- **ESPECÍFICOS:**

- ✓ Aportar los aislamientos al banco de cepas de MNT del Centro de Investigaciones Biomédicas
- ✓ Implementar una ayuda educativa para la divulgación del riesgo potencial para la salud humana de las MNT asociadas a SDAP

METODOLOGÍA

1 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

201 grifos



100 muestras (x3)



Se centrifugo 4400g x 45 min



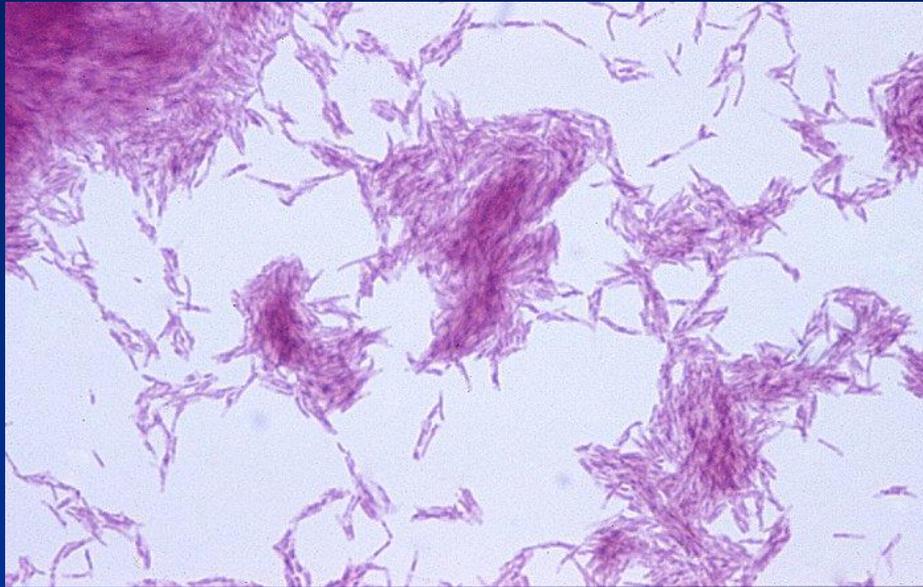
Se decontaminó con NaOH 4%



Se sembró con escobillón en LJ
a 37°C



2. AL OBSERVAR CRECIMIENTO SE REALIZO TINCIÓN DE ZIEHL NEELSEN



Bacilos acido resistentes

3 IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA

IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA

- **Tiempo de Crecimiento**
- **Producción de pigmento**
- **Crecimiento en diferentes temperaturas**
- **Crecimiento en diferentes medios de cultivo**

IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA

- **Crecimiento en presencia de diferentes sustancias químicas:**
 - Hidracida del ácido 2 tuiofen carboxílico (TCH) 10 μ g/ml
 - Cloruro de sodio (NaCl) 5%
 - Hidroxilamina (HA) 250 μ g/ml
 - Isoniacida (INH) 10 μ g/ml

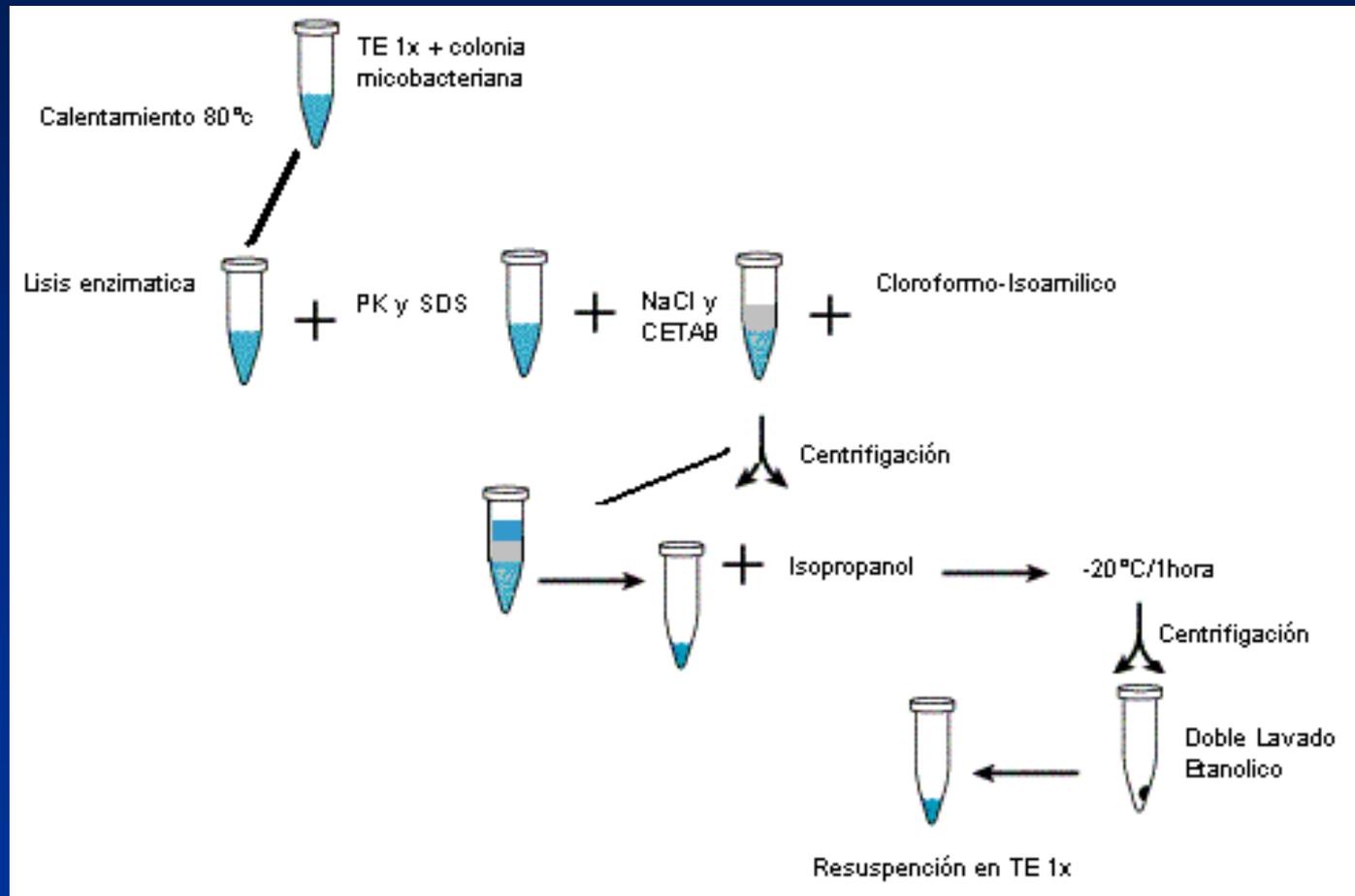
IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA

- **Pruebas enzimáticas:**
 - Actividad de catalasas
 - Reducción de nitrato
 - Hidrólisis de tween 80
 - Ureasa
 - Pirazinamidasas 4 y 7 días
 - Fosfatasa ácida
 - Arilsulfatasa 3 y 14 días
 - Captación de hierro

4 IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA (PRA)

IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA

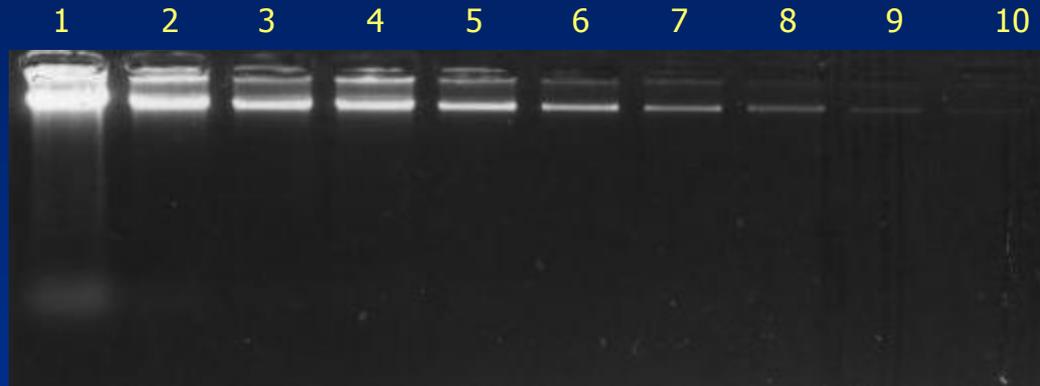
• Extracción y cuantificación de ADN



Protocolo Casero de extracción de ADN micobacteriano de Van Embdem

IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA

• Estimación de la concentración de ADN por tinción con bromuro de etidio



Contenido de ADN: 1=1, 2=0.5, 3=0.25, 4=0.20, 6=0.17, 7=0.13, 8=0.11, 9=0.08 y 10=0.05. Gel de Agarosa al 0.8% - Buffer de carga con ARNasa

IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA

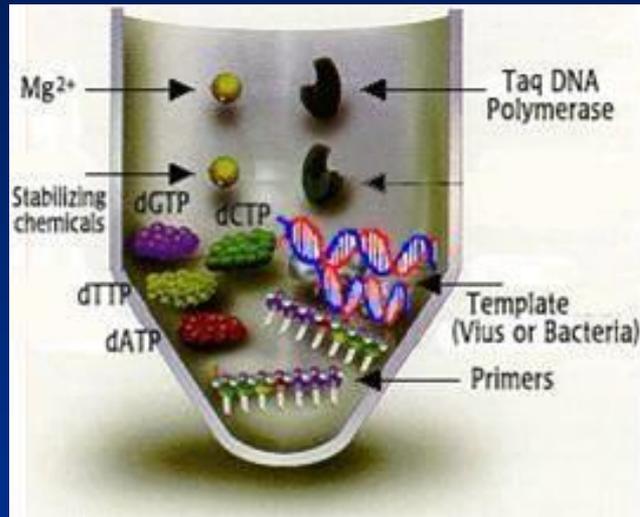
• Amplificación del gen *hsp65*

Amplificación por PCR de un fragmento de 441 pb del gen *hsp65*.

El gen *hps65* es un gen que codifica para una proteína de choque térmico (Del inglés Heat Shock Protein 65 KDa) conservada y esta presente en todas las micobacterias. Este gen permite diferenciar específicamente algunas especies de micobacterias.

IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA

Condiciones de la PCR



Denaturación inicial 96°C x 5 minutos

Denaturación 94°C x 1min

Anillado 60°C x 1min

Extensión 72°C x 1min

Extensión final 72°C 7 min

45
ciclos

Reactivo [final]	Cantidad µL
Buffer	5
MgCl	1.5
dNTPs	4
Tb 11*	1
Tb 12*	1
Glicerol	5
Taq polimerasa	0.5
Agua Mq	22
ADN (MNT)	10
Volumen final	50

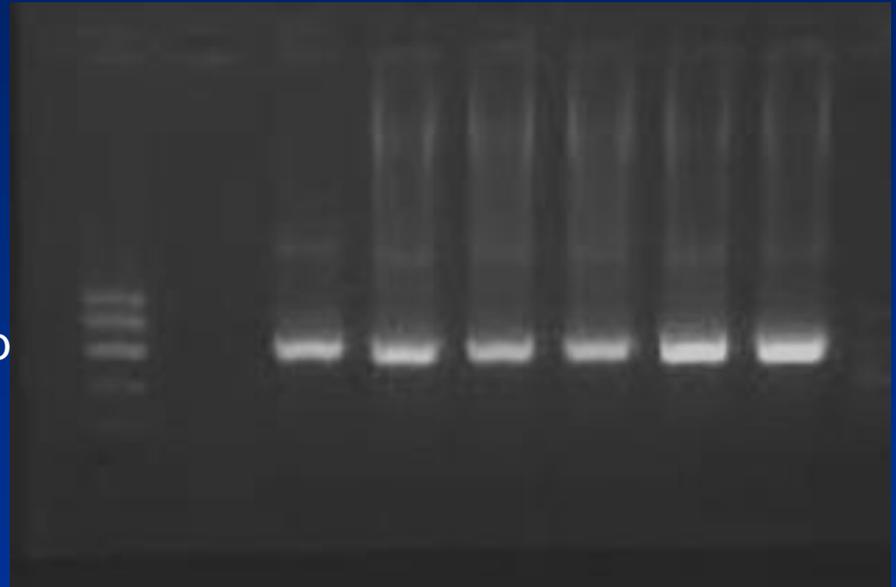
*Telenti, *et al.* Rapid identification of micobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.* 31:175-178.1993.

IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA

Verificación de la amplificación, gel de agarosa al 2%



441 pb



Amplificación del gen *hsp65*. M, marcador de PM. 1: CN 2-6: ADN de MNT

IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA

- **Análisis de patrones de restricción (PRA)**

- Luego de la amplificación se realiza la digestión enzimática:

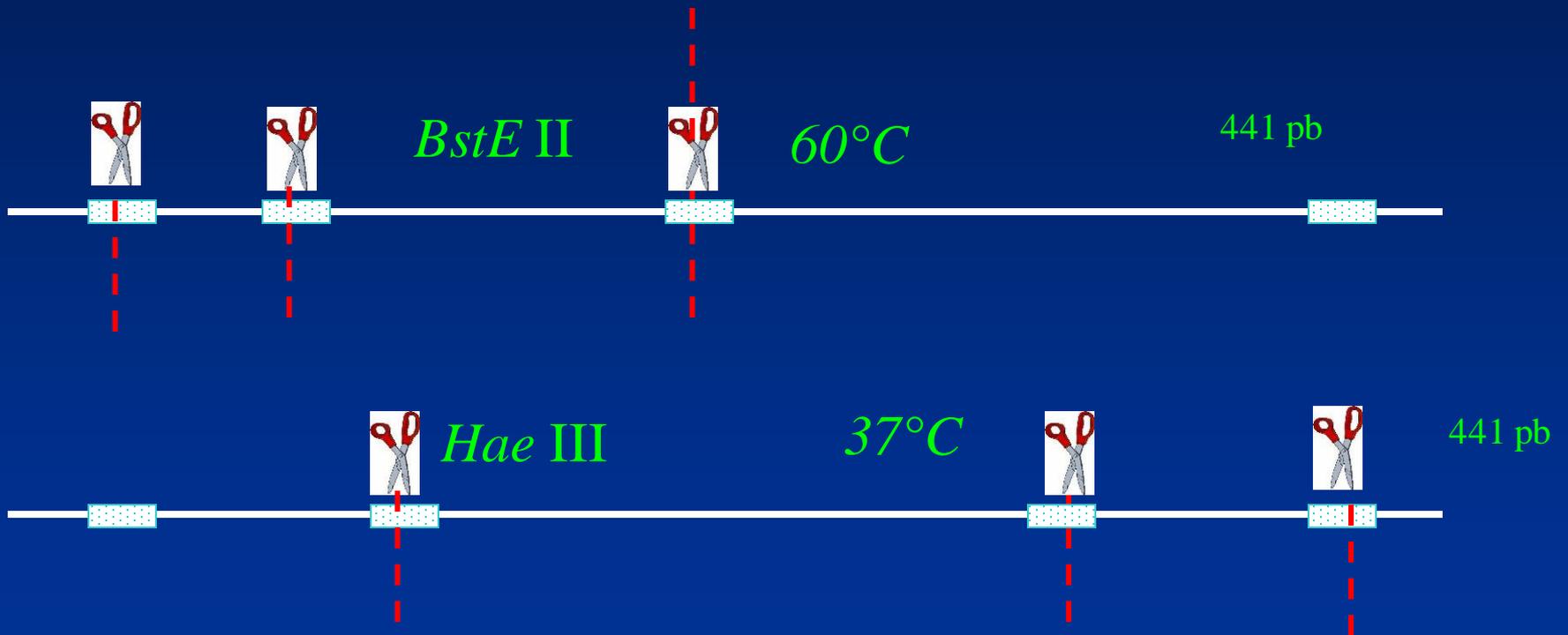
HaeIII

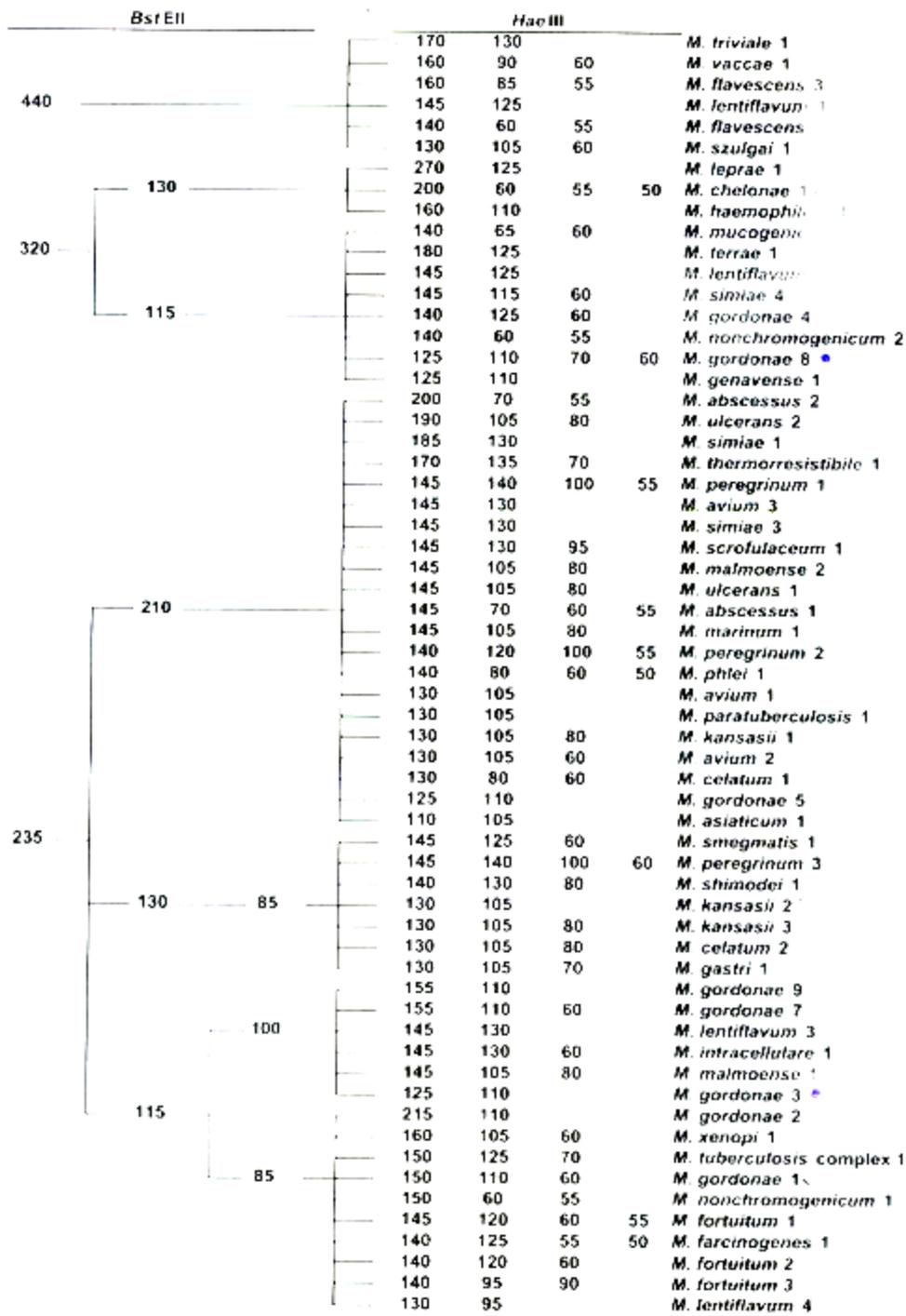
BstEII

- **Análisis de patrones de corte permite diferenciar especies y subtipos de Micobacterias.**

IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA

Gen hsp 65





ALGORITMO, PATRONES DE PRA

Condiciones de la restricción

- 15 μ l Producto de PCR
- 2.5 μ l Buffer específico para cada enzima
- 1 μ l Enzima
- 6.5 μ l Agua Mq

Volumen final 25 μ l

Incubación toda la noche para ambas enzimas, la digestión se detuvo adicionando 25ul de buffer de carga

IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA

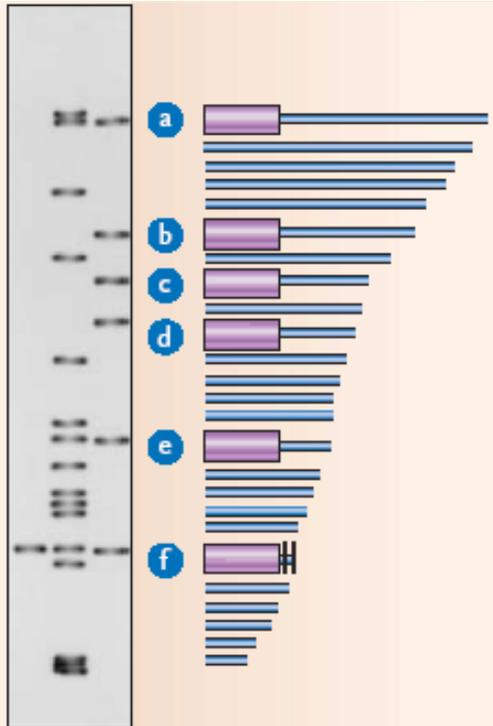
Separación de los fragmentos por electroforesis

- Gel de agarosa al 4 %
- Bromuro de etidio
- Marcador 50 pb
- En el gel se sembraron 50 μ l
- 2 horas a 75 voltios.
- Los geles se documentaron con cámara polaroid



IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA

- Análisis del tamaño de los patrones de restricción (PRA)



PRASITE

IDENTIFICATION OF MYCOBACTERIA



Help
Method

Query forms
Species names
PRA pattern

Recent results
Submission and Contact
Copyright notice
Credits

 CHUV -
Les
Hospices
Cantonaux

 INSTITUT PASTEUR

 Swiss
National
Center for
Mycobacteria

This site has been designed for optimum viewing with 13.5 inch monitors using 480 x 640 settings. Default fonts are used. This site is best viewed with [Internet Explorer 4 or greater](#).

Copyright © 1999 Hospices cantonaux last update : 30-May-2000

PRASITE <http://app.chuv.ch/prasite>

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

- Las pruebas fenotípicas se procesaron mediante la prueba del Signo que utiliza la distribución binomial acumulativa.
- A cada prueba de identificación se le realizó análisis de frecuencia.

RESULTADOS Y DISCUSION

IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA

- Se obtuvieron 16 cultivos con crecimiento de BAAR positivo.
- 9 aislados fueron posteriormente identificados como *Mycobacterium gordonae* y 2 de *Mycobacterium scrofulaceum*.
- 5 aislados no pudieron ser identificadas.

IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA

Mycobacterium gordonae:
Colonias amarillas y naranja,
mucoides, escotocrómicas
de lento crecimiento a 37°C.

Mycobacterium scrofulaceum:
Colonias en amarillo intenso,
lisas, escotocrómicas de
lento crecimiento a 37°C.



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

PRUEBAS ENZIMÁTICAS

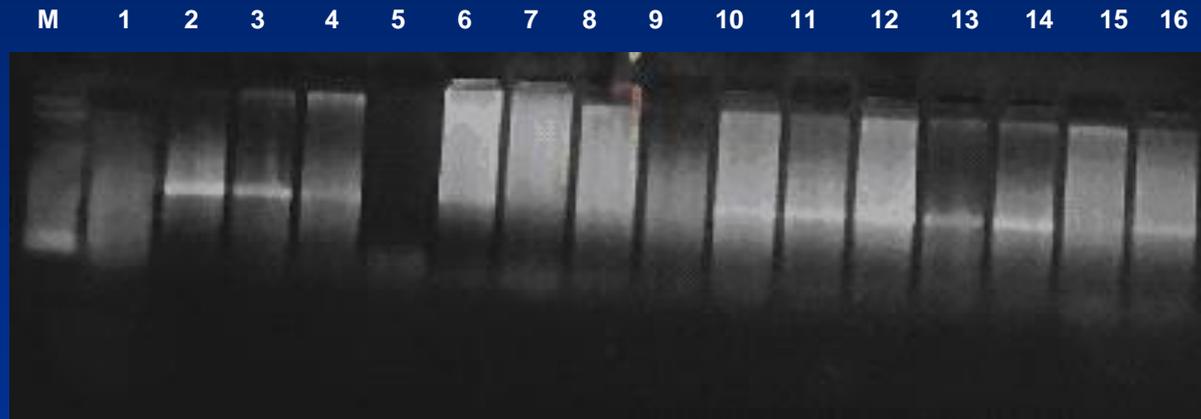
- Hidrólisis de tween 80
- Reducción de nitrato
- Actividad de catalasas
- Ureasa
- Pirazinamidasas 7 día
- Fosfatasa ácida
- Arilsulfatasa 3 día



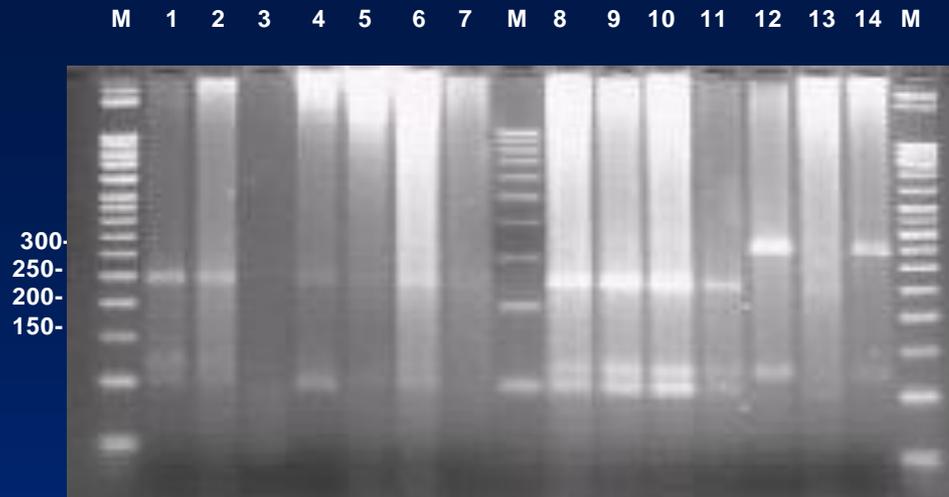
Concentración de ADN genómico en $\mu\text{g}/\text{ul}$ de las 14 cepas de MNT

MUESTRA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
CONCENTRACIÓN	0.5	0.5	0.1	0.13	0.1	0.5	0.13	1	1	1	0.08	0.5	0.5	0.25

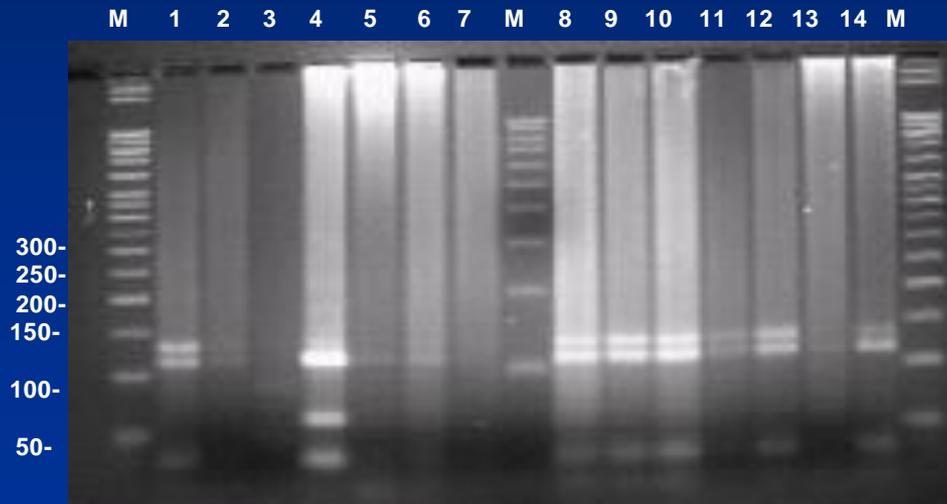
441pb



Amplificación del gen *hsp65* por PCR. M: Marcador de peso molecular. 1: control negativo, 2: Mt, 3-16 ADN de MNT



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



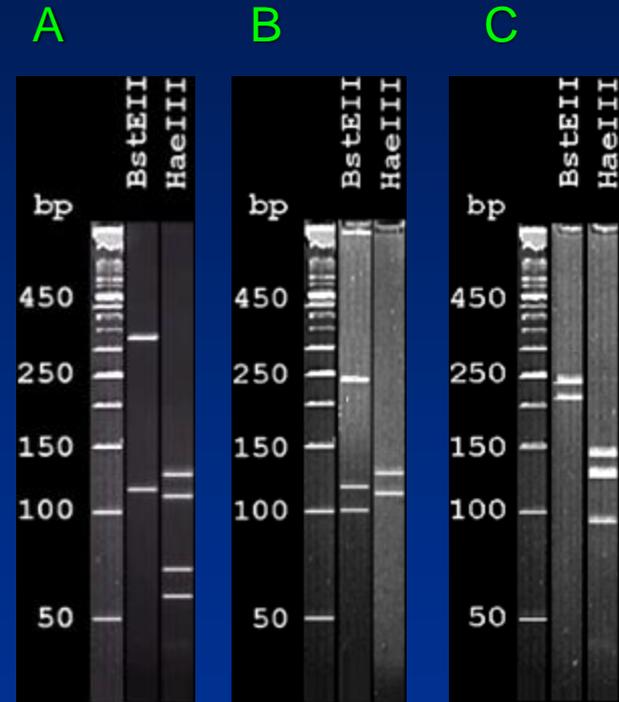
Restricción del gen *hsp65* con *Hae III*. M: Marcador de peso molecular. 1-14 Aislados de MNT

IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA

A. *Mycobacterium gordonae*-3:
100/120/240 para *BstE* II y de
130/110 para *Hae* III

B. *Mycobacterium gordonae*-8:
325/120 para *BstE* II y de
130/110 para *Hae* III

C. *Mycobacterium scrofulaceum*-
1: 240/100 para *BstE* II y de 110
para *Hae* III



A. *Mycobacterium gordonae*-3

B. *Mycobacterium gordonae*-8

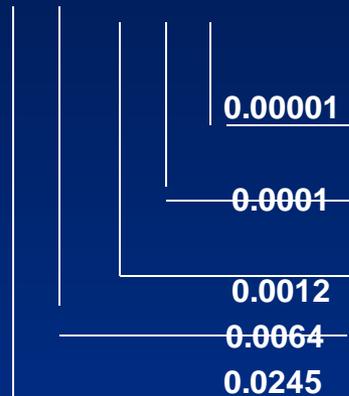
C. *Mycobacterium scrofulaceum*-1

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

Crecimiento BAAR positivo, localización del grifo y resultados fenotípicos y genotípicos. SI: Sin Identificar

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17



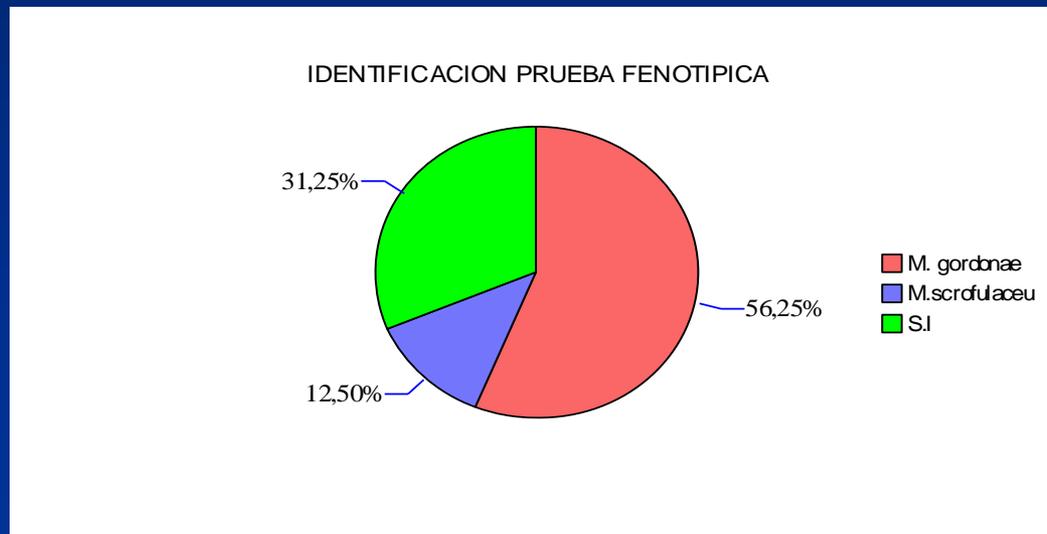
Distribución Binomial Acumulativa Inversa.

AISLADO	P.A	Urea	Fosf.a	Capt.h	Cat.s.q	25°c	37°c	Correlación	Significancia
<i>M. gordonae</i>	+/-	-	+/-	+	+	+	+/-		
Número 1	-	+	-	-	+	+	+	14	0.64%
Número 5	-	-	-	-	+	+	+	15	0.12%
Número 7	-	+	-	-	+	+	+	13	2.45%
Número 8	-	+	-	-	+	+	+	13	2.45%
Número 10	-	+	-	-	+	+	+	15	0.12%
Número 11	-	+	-	-	+	+	+	15	0.12%
Número 12	-	+	-	-	+	+	+	16	0.01%
Número 14	-	+	-	-	+	+	+	16	0.01%
Número 15	-	+	-	-	+	+	+	16	0.01%
<i>M.scrofulaceum</i>	+	+	-	-	+	+	+		
Número 4	-	+	-	-	+	+	+	16	0.01%
Número 6	-	+	-	-	+	+	+	14	0.64%

Especificidad de la prueba Fenotípica. P.A: Pirazinamidasasa, Urea: Ureasa, Fosf.a: Fosfatasa ácida, Capt.h: Captación de hierro, Cat s.q: Catalasa semicuantitativa, Correlación, Significancia.

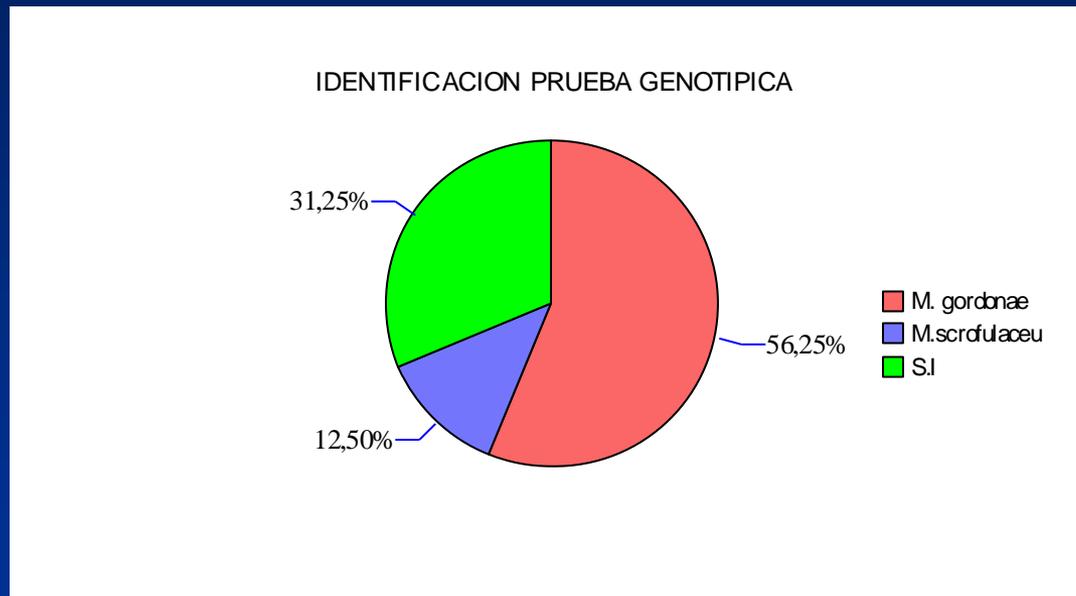
ANÁLISIS DE FRECUENCIAS:

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



Porcentaje de las frecuencias acumulativas para la Identificación fenotípica.

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



Porcentaje de las frecuencias acumulativas para la Identificación genotípica.

AYUDA PEDAGOGICA

Las micobacterias ambientales, también denominadas No tuberculosas (MNT) son un grupo de bacterias que pueden causar

enfermedades en las personas. El grupo de las MNT, pueden ser encontradas en el suelo, aire, agua, y alimentos. Las MNT sobreviven y se pueden multiplicar en las tuberías de distribución de agua, piscinas y acuarios.



ESTAS SON ALGUNAS DE LAS ENFERMEDADES CAUSADAS POR LAS MNT EN EL AGUA DEL GRIFO:

- Enfermedad Pulmonar
- Inflamación de los ganglios
- Ulceras de piel y tejidos blandos: piel, músculos y algunos órganos

¿TIENES EL SISTEMA INMUNE BAJO?



.Personas Immunocomprometidas
Con sida y otras enfermedades como cáncer diabetes, transplantes y enfermedades pulmonares.

.Personas quienes tienen contacto prolongado con reservas de agua. (Pescadores, practicantes de natación).



.Quienes tienen historia de lesiones en piel o heridas pequeñas.



.Personas sin condiciones de predisposición.



¿CUÁLES SON LOS MODOS DE TRANSMISIÓN?



- Inhalación de aerosoles contaminados.
- Ingestión de agua o comida contaminada.
- La transmisión de persona a persona es poco probable.



Las pruebas de calidad del agua potable comprenden análisis físicos, químicos y microbiológicos. Las MNT no son incluidas como un parámetro en el análisis microbiológico del agua.

Método de toma de recolección de las muestras

- **El éxito de un aislamiento esta influenciado por varios factores:**
 - ◆ **Decontaminación**
 - ◆ **Medios de cultivo**
 - ◆ **Temperatura**
- **La utilización de métodos de aislamiento y identificación de MNT más específicas es una necesidad imperiosa.**

Validez de la prueba de oro

- La identificación se realizó mediante pruebas bioquímicas convencionales las cuales presentan limitaciones en cuanto al tiempo de crecimiento, cantidad de inóculo y la dificultad de identificar subtipos.
- Los resultados de las pruebas fenotípicas indican la presencia de *M. gordonae* y *M. scrofulaceum* de acuerdo a la clasificación de Runyon.
- Es importante tener en cuenta que la identificación fenotípica no se puede sustentar en una sola prueba. (caso de la catalasa)
- Es indispensable utilizar no solo la técnica convencional de detección e identificación si no también emplear la técnica fenotípica.

Distribución de *M. gordonae* y *M. scrofulaceum* en la naturaleza

- *M. gordonae* y *M. scrofulaceum* son consideradas no patógenas pero podrían representar un riesgo potencial para el desarrollo de infecciones especialmente en pacientes inmunocomprometidos.
- *M. gordonae* es una MNT frecuentemente aislada del agua.
- *M. scrofulaceum* es asociada a fuentes hídricas como lagos y ríos en climas calidos. No hay reportes que se encuentren en los SDAP.

Implicaciones en la salud pública de las MNT

- Hace varios años se ha publicado informes evidenciando la presencia de MNT saprofitas potencialmente patógenas en los SDAP en diferentes países.
- La presencia de *M. gordonae* y *M. scrofulaceum* en los SDAP puede ser explicada por la permeabilidad de la pared celular.
- Un estudio reciente de la Secretaria de Salud de Armenia determinó que el 14% de infectados por VIH en el municipio de Armenia tienen formación universitaria.

CONCLUSIONES

- Aunque las especies encontradas en este estudio no están descritas como patógenas, se constituye en un riesgo potencial para el desarrollo de infecciones, especialmente en los estudiantes VIH positivos y con otros compromisos inmunológicos de la Universidad de Quindío .
- La epidemiología de las MNT no esta completamente entendida por lo cual se debe estudiar aspectos como la fuente, ruta de infección y su patogénesis.

- Los resultados que arrojan las pruebas genotípicas y las fenotípicas de las micobacterias tienen una gran correlación entre ellas.
- La resistencia de las MNT a los desinfectantes nos sugieren que se deben realizar investigaciones a nivel genético y metabólico.
- Debido a que en el Municipio de Armenia la incidencia del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) son de 2,1 por 10.000 habitantes y el grupo de edad afectado con mayor frecuencia esta entre los 25 y 34 años.

RECOMENDACIONES

- En general las infecciones ocurren en pacientes quienes tienen contacto prolongado con reservas de agua, lesiones en la piel, microtraumas y inmunocomprometidos deben:
 - No tomar el agua que proviene de los grifos.
 - Hervir el agua que se consume en casa.
 - Evitar lavar las heridas con agua de grifo.

AGRADECIMIENTOS

- *Dr. Arley Gómez López*
- *Sandra Milena C. Clara Juliana D. y Nelson Enrique A*
- *Laura Cuervo*
- *Claudia Marcela C. MSc*
- *Semillero de Investigación en patogénesis molecular*
- *Dr. Marco Antonio Nieto*
- *Dr. Jorge Enrique Gómez*
- *Dr. Liliana Quintero*
- *A todo el Centro de Investigaciones Biomédicas por toda su colaboración.*
- *Programa de Licenciatura en Biología y Educación Ambiental.*
- *A todas las personas que de una u otra forma aportaron sus ideas y tiempo en la realización de este trabajo*