



# UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

Facultad de Ciencias Naturales y Ambientales

## **AISLAMIENTO Y GENOTIPIFICACIÓN DE LAS PRIMERAS MICOBACTERIAS AMBIENTALES EN EL CENTRO-NORTE DEL ECUADOR**

Realizado por: Victor Eduardo Muşoiu Cedeño  
Dirección del Proyecto: Juan Carlos Navarro, Ph. D  
Quito, 18 de febrero de 2020

# Contenido

Introducción

Objetivos e Hipótesis

Metodología

Resultados

Conclusiones

Bibliografía



ECUADOR  
UNIVERSIDAD  
INTERNACIONAL  
**SEK**  
SER MEJORES

# Introducción

- Micobacterias: asociadas a infecciones crónicas en humanos y animales.
- Anualmente se reportan a nivel mundial aproximadamente 9,4 millones de casos de infecciones causadas por micobacterias (Hupp, Ferneini, Zeller, & Ferneini, 2016).
- Un quinto corresponden a micobacterias ambientales (Peto, Pratt, Harrington, LoBue, & Armstrong, 2009).
- Escasa investigación sobre micobacterias ambientales en la región.



**Diagrama 1:** Infección por *M. chelonae*  
**Fuente:** (Uslu, Böhm, Heppt, & Sticherling, 2019)



**Diagrama 2:** Cultivo *M. chelonae*  
**Fuente:** (Lage et al., 2015)

# Hipótesis



- Existen micobacterias ambientales en los cuerpos de agua del centro-norte del Ecuador y se pueden identificar mediante el análisis de RFLP (restriction fragment length polymorphism).

# Objetivos



## General

- Demostrar la presencia de micobacterias en cuerpos de agua del centro-norte del Ecuador, mediante cultivo bacteriológico a dos temperaturas diferentes (29 °C y 37 °C).

## Específicos

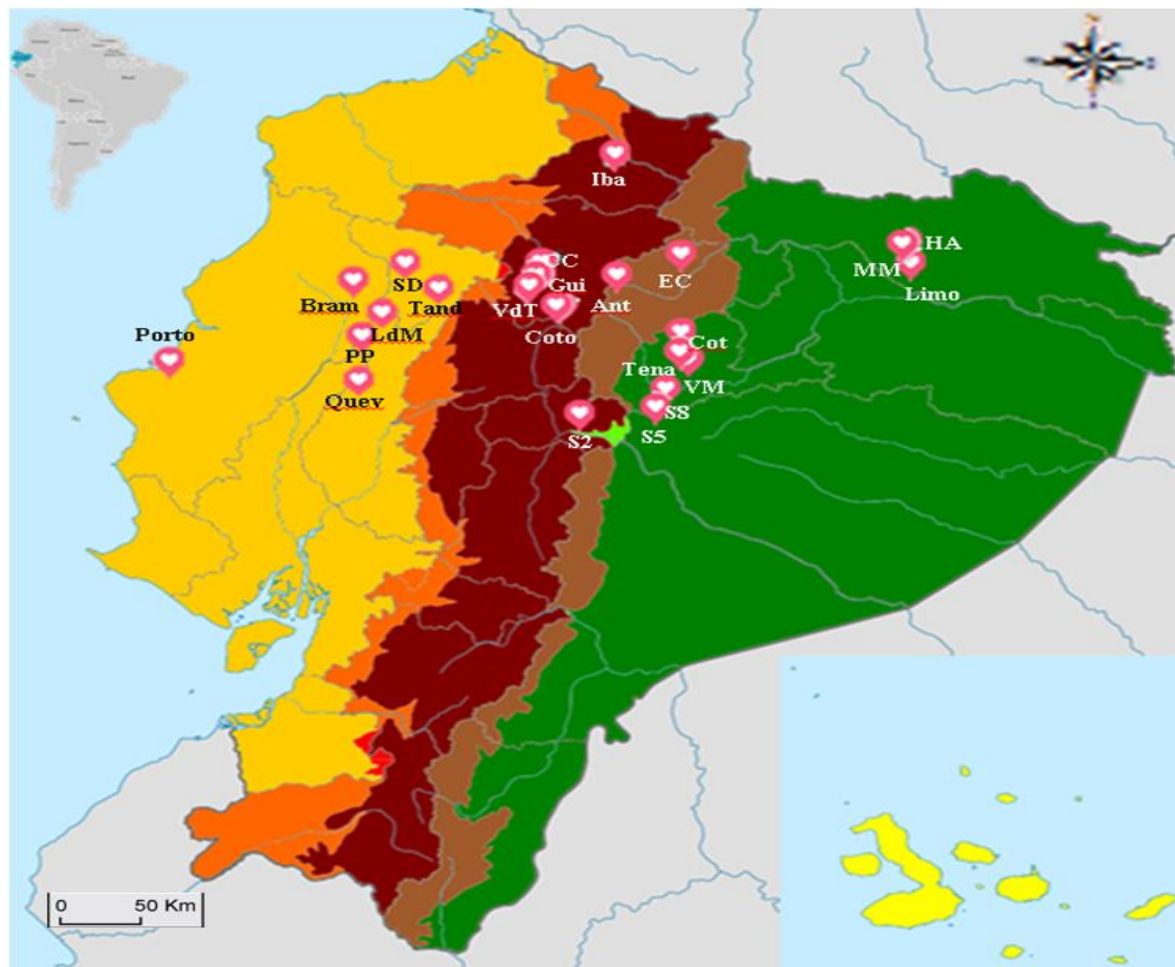
- Identificar y tipificar mediante el análisis de RFLP las cepas obtenidas.
- Determinar la riqueza de especies según región y piso ecológico



ECUADOR  
UNIVERSIDAD  
INTERNACIONAL  
**SEK**  
SER MEJORES

# Metodología

# Muestreo



*Diagrama 3: Mapa de puntos de muestreo*  
*Elaborado por: autores*



# Muestreo



**Tabla 1:** Puntos de muestreo según región

| Puntos de muestreo según región |        |          |
|---------------------------------|--------|----------|
| Costa                           | Sierra | Amazonía |
| 6                               | 19     | 16       |

*Elaborado por:* autores

**Tabla 2:** Puntos de muestreo según piso ecológico

| Puntos de muestreo según piso ecológico |                            |                         |                             |                                          |                          |               |
|-----------------------------------------|----------------------------|-------------------------|-----------------------------|------------------------------------------|--------------------------|---------------|
| Tierras bajas<br>(<600)                 | Montano bajo<br>(600-2000) | Montano (2000-<br>3000) | Montano alto<br>(3000-3700) | Montano alto<br>superior (3700-<br>4300) | Subnival (4300-<br>4500) | Nival (>4500) |
| 22                                      | 3                          | 9                       | 3                           | 2                                        | 1                        | 1             |

*Elaborado por:* autores

**Clasificación de pisos climáticos:** (Ministerio de Ambiente del Ecuador, 2012)



# Cultivo Microbiológico



ECUADOR  
UNIVERSIDAD  
INTERNACIONAL  
**SEK**  
SER MEJORES

Pretratamiento

Filtración

Incubación

# Cultivo Microbiológico



ECUADOR  
UNIVERSIDAD  
INTERNACIONAL  
**SEK**  
SER MEJORES

## Pretratamiento

- HPC al 0,005% durante 20 minutos.

## Filtración

- Membranas Millipore 0,45  $\mu\text{m}$  y rampa de filtración.

## Incubación

- 29 °C y 37 °C durante 12 semanas.



***Fuente: (Merck, 2020a)***



***Fuente: (Merck, 2020b)***

# Cultivo Microbiológico



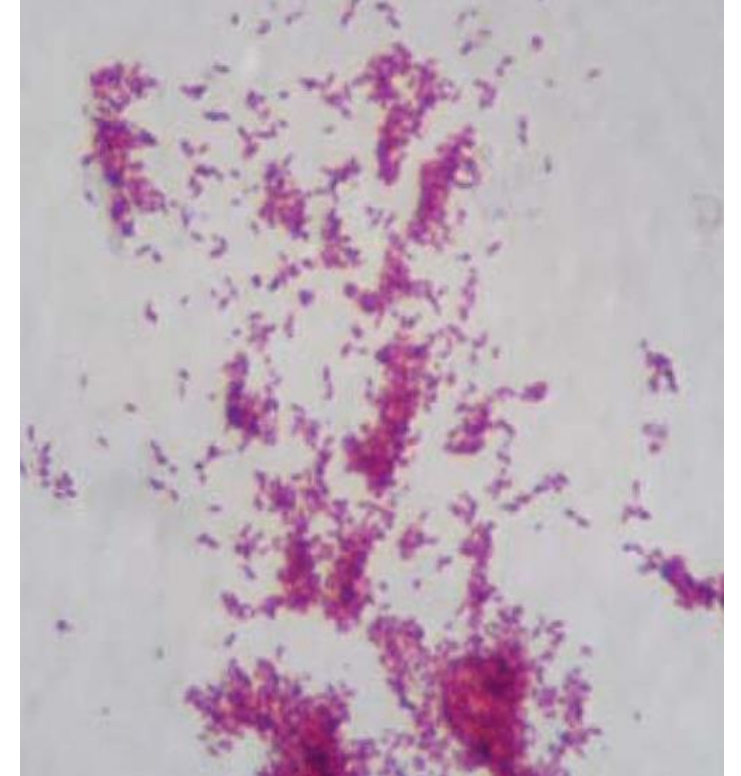
## Medio de cultivo

- 30 g/L de TSA
- 5 000 µg/mL de Polimixina
- 2 mg/mL Ácido nalidíxico
- 0,5 mg/mL Trimetoprim
- 1 µg/mL Azlocilina
- 0,5 mg/mL Anfotericina B
- 1% de glicerol (como fuente alterna de carbono).

*Fuente: (Radomski et al., 2008)*

# Procesamiento de Colonias

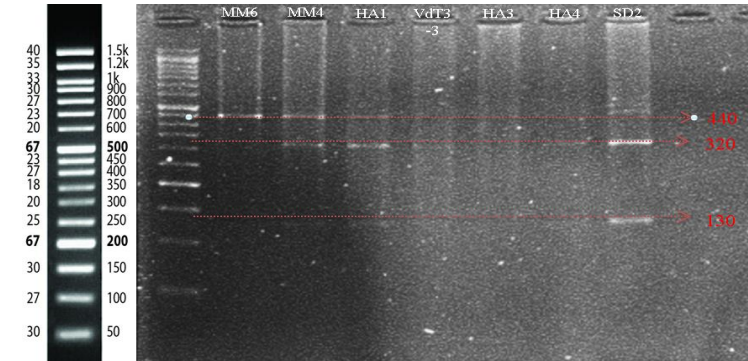
- Ziehl-Neelsen
- Tubos TE (Tris-EDTA)
- Aislamiento de ADN mediante boiling.



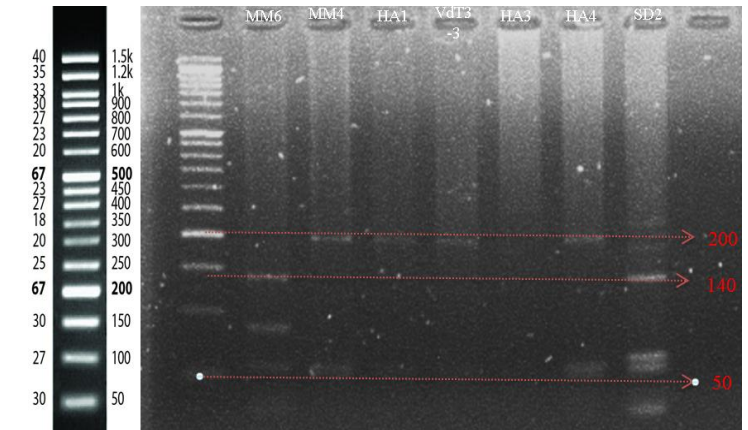
*Diagrama 4: Tinción Ziehl-Neelsen  
M. chelonae  
Fuente: (Lage et al., 2015)*

# Genotipificación

- P1/P2 (pertenencia a género *Mycobacterium*)
- Tb11/Tb12 (*hsp65*)
- BstEII y BsuRI (HaeIII)
- PRA-Site (algoritmo de determinación de especie de micobacteria)



**Diagrama 6: BstEII**  
**Elaborado por: autores**



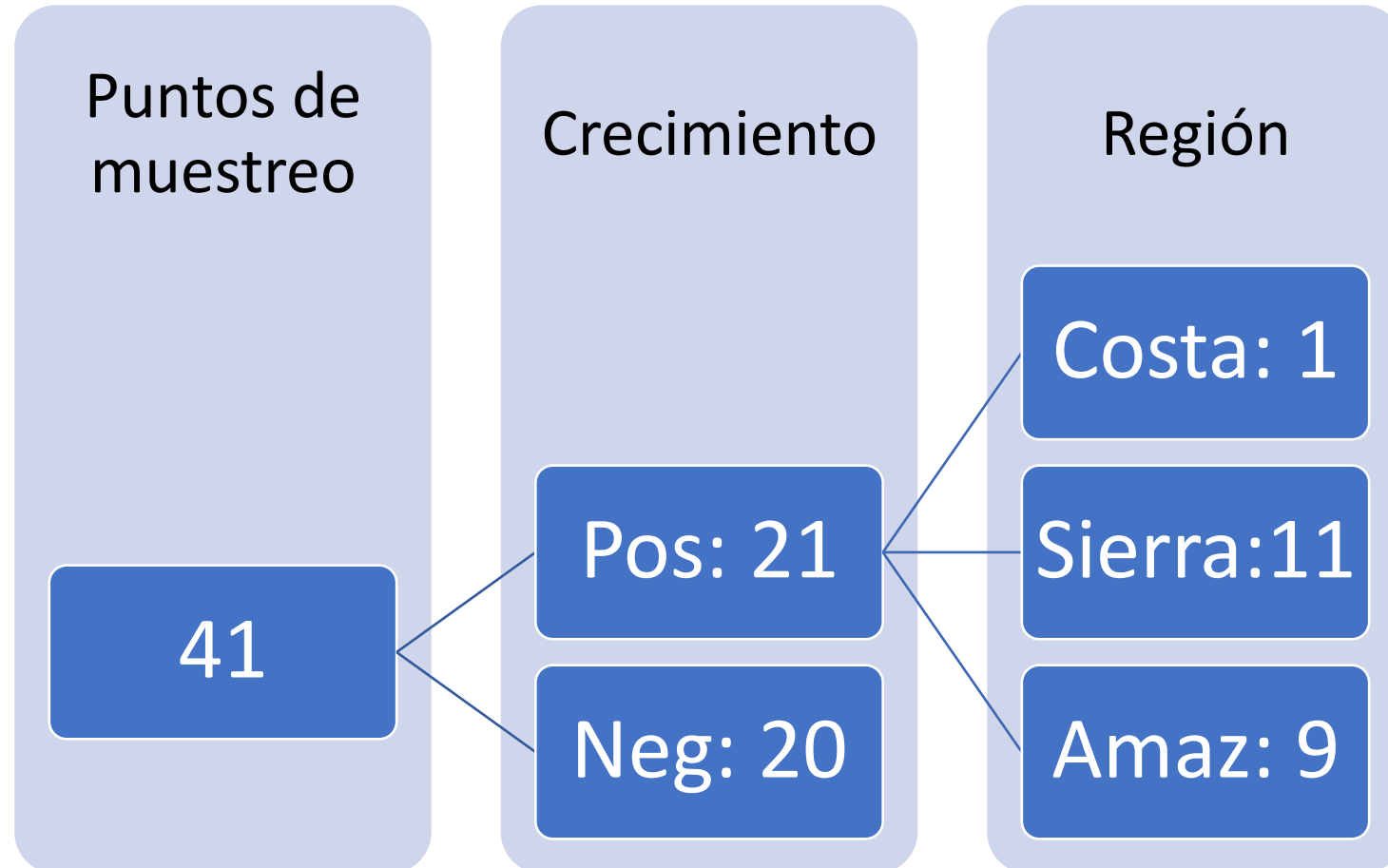
**Diagrama 6: BsuRI (HaeIII)**  
**Elaborado por: autores**



ECUADOR  
UNIVERSIDAD  
INTERNACIONAL  
**SEK**  
SER MEJORES

# Resultados

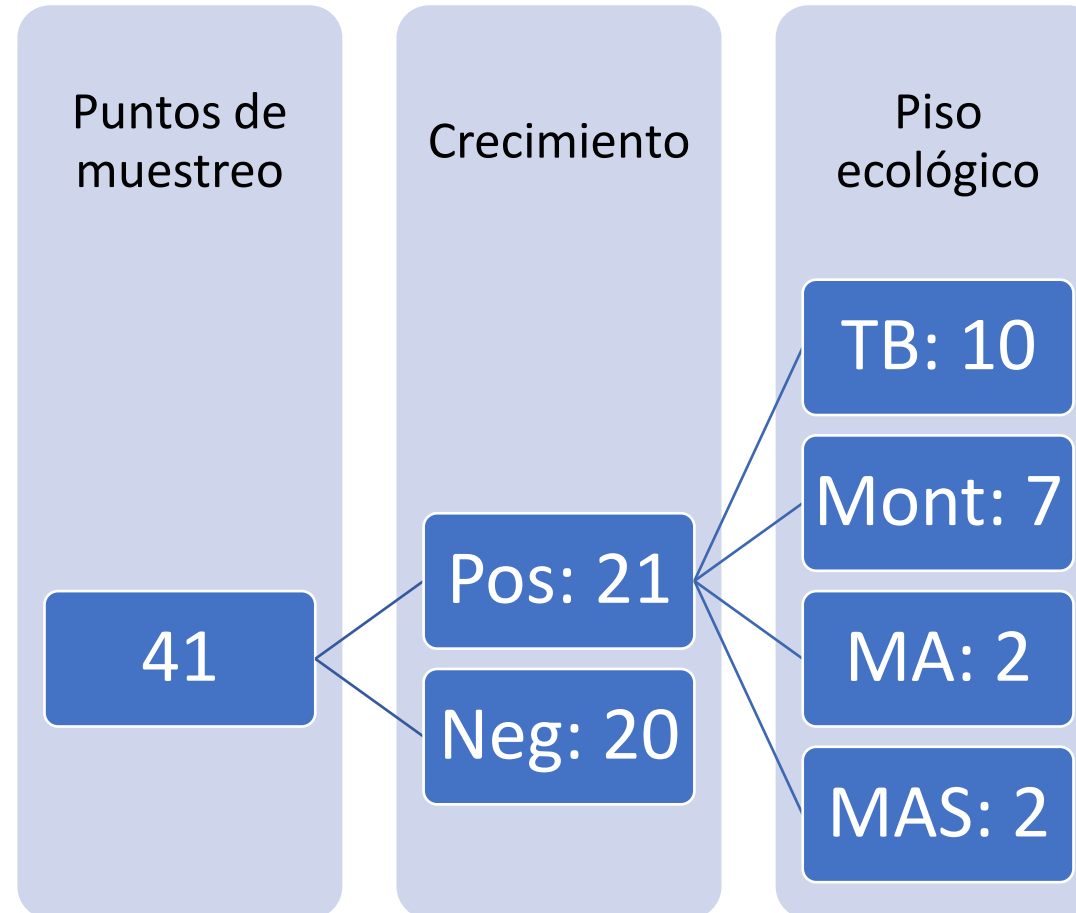
# Crecimiento según Región



*Diagrama 7: Crecimiento según región*  
*Elaborado por: autores*

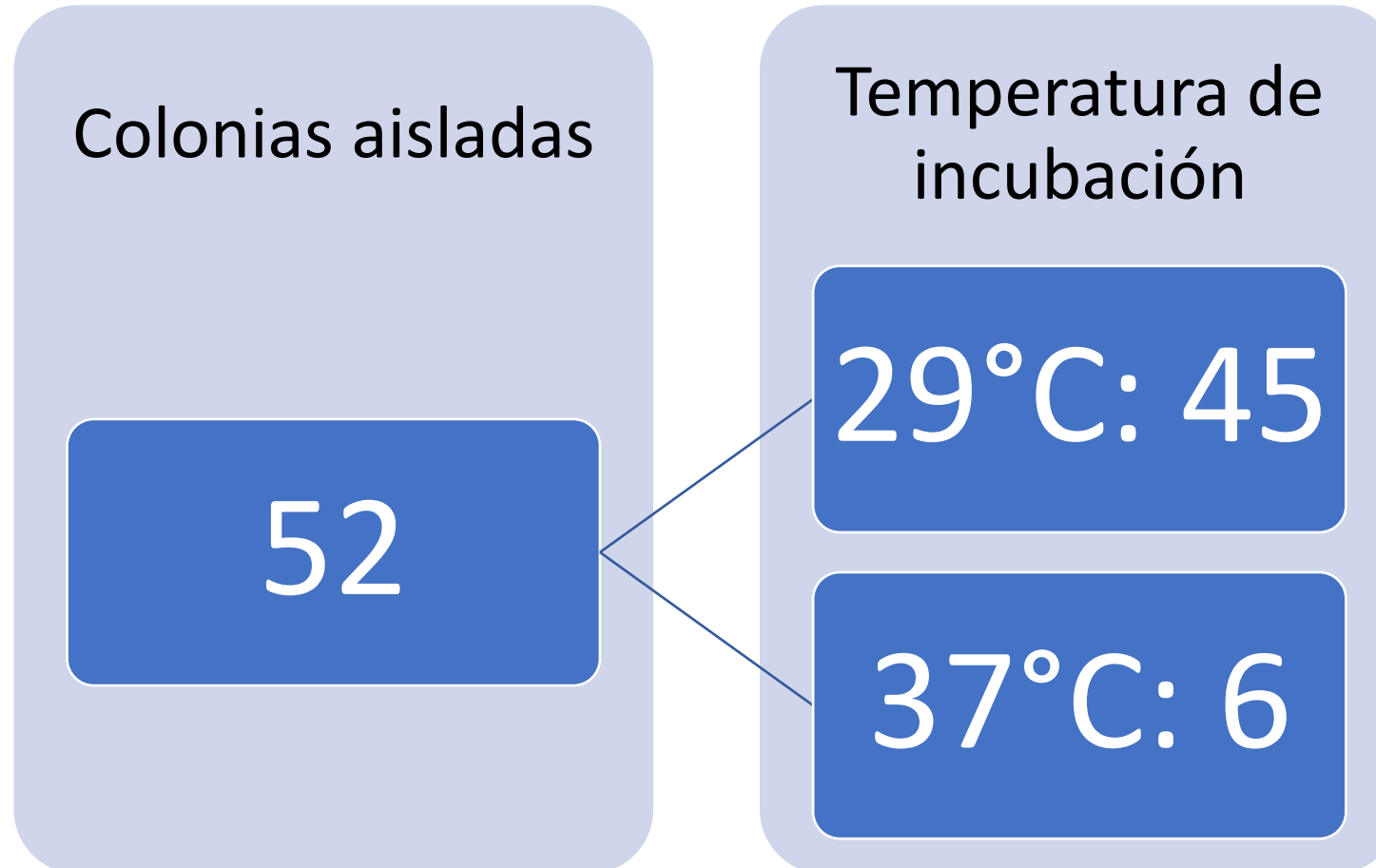


# Crecimiento según Piso Ecológico



**Diagrama 8:** Crecimiento según piso ecológico  
**Elaborado por:** autores

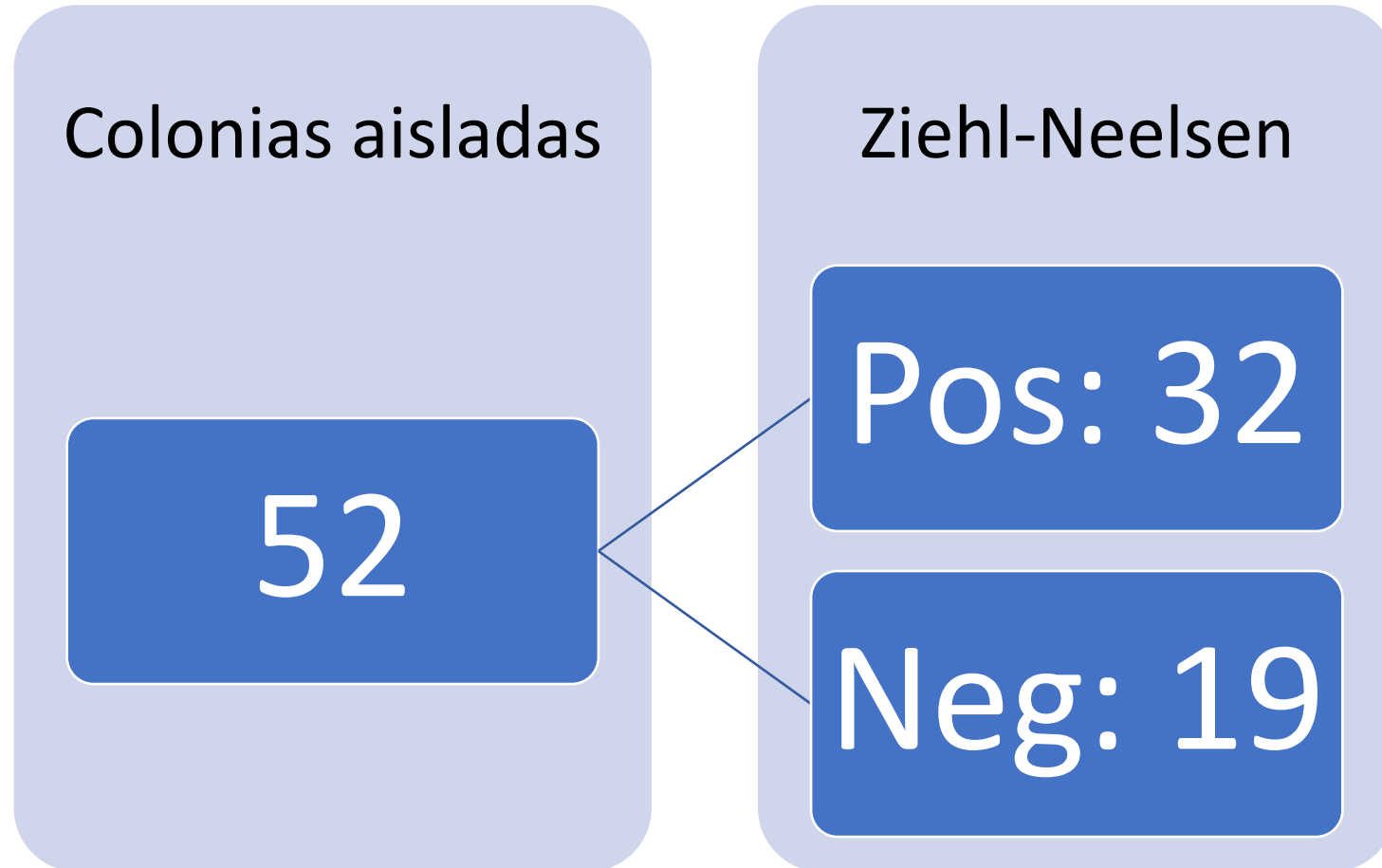
# Colonias por temperatura



**Diagrama 9:** Crecimiento de colonias según temperatura de incubación

**Elaborado por:** autores

# Ziehl-Neelsen

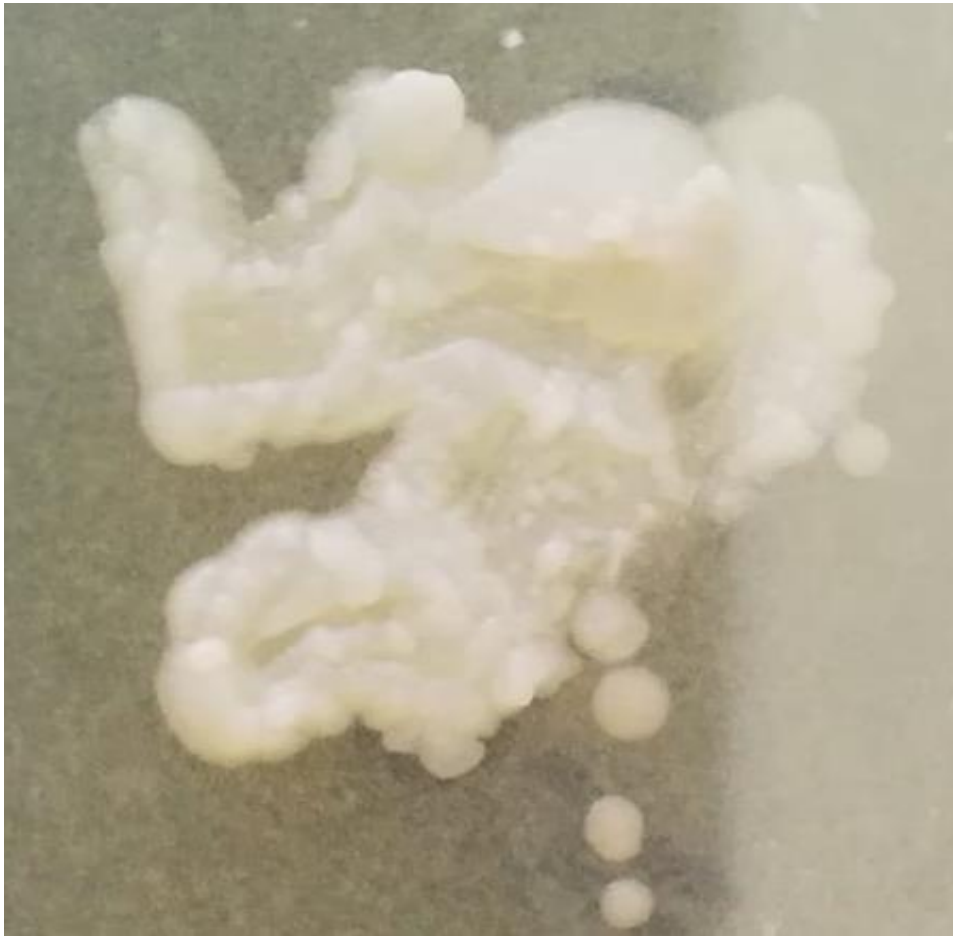


*Diagrama 10: Resultados microscopía-Tinción Ziehl-Neelsen*  
*Elaborado por: autores*

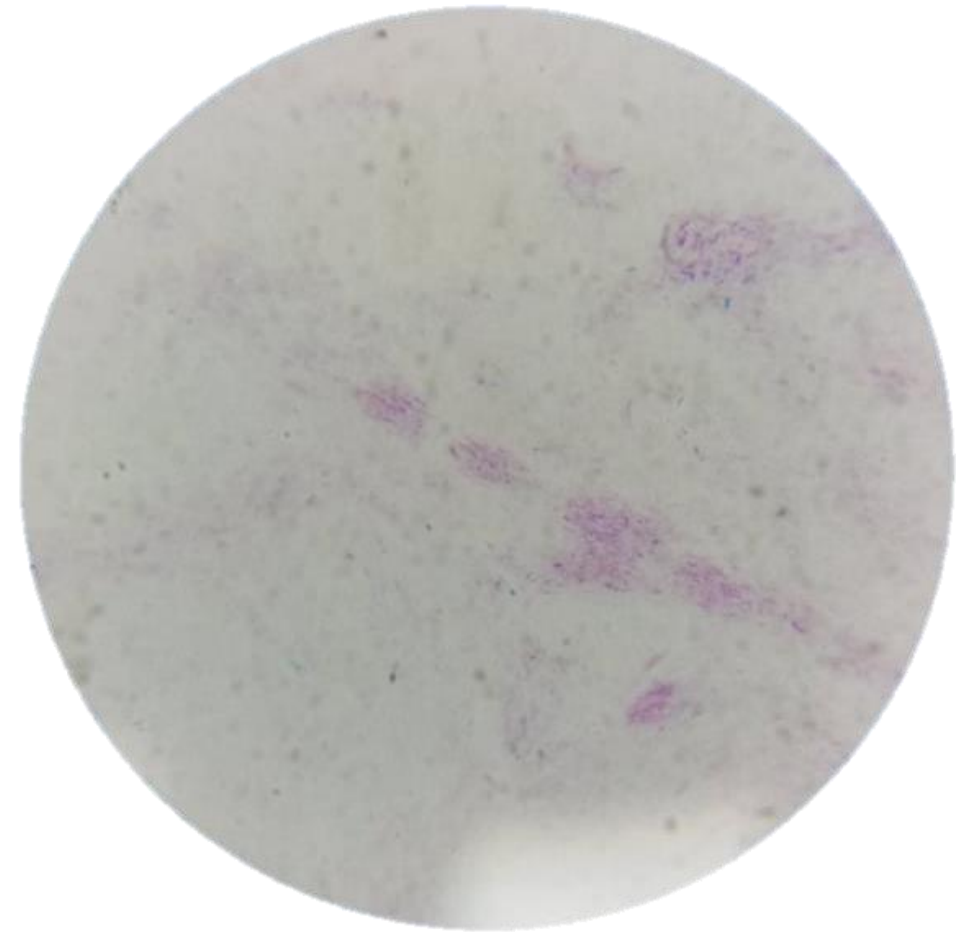
# Ziehl-Neelsen



UNIVERSIDAD  
INTERNACIONAL  
**SEK**  
SER MEJORES

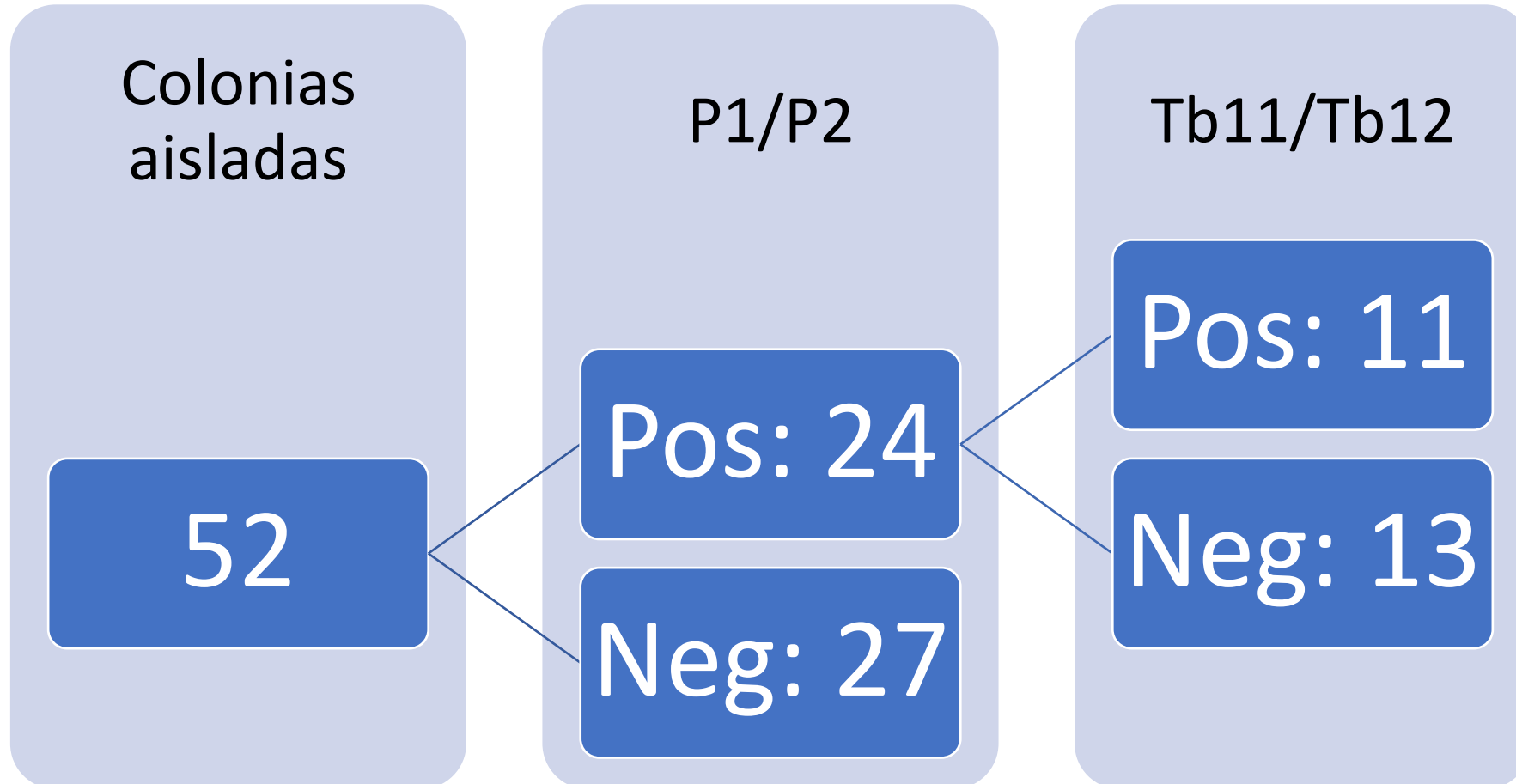


**Diagrama 11:** *M. chelonae* aislado de Hacienda Albán  
**Elaborado por:** autores



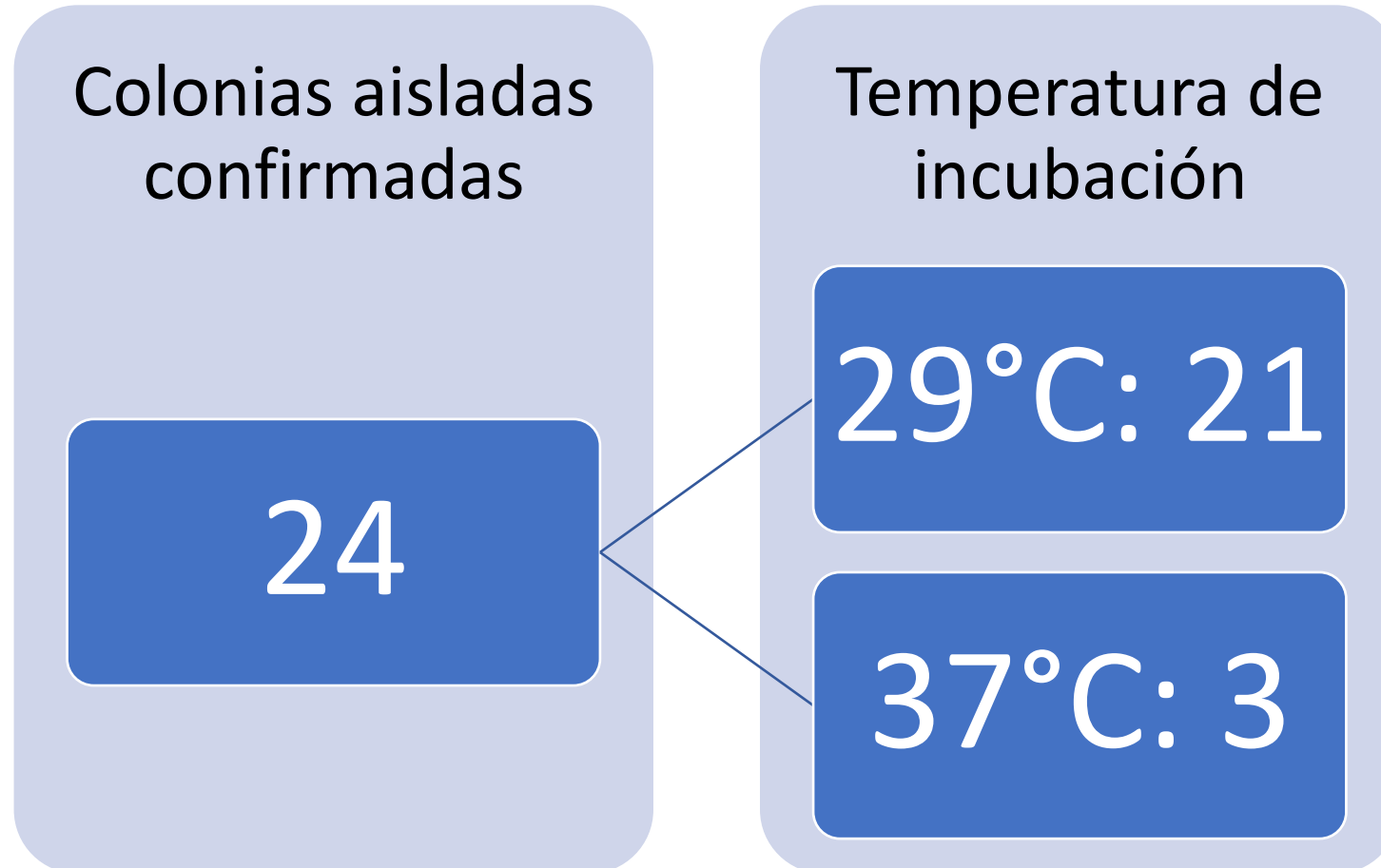
**Diagrama 12:** Tinción Ziehl-Neelsen *M. chelonae* aislado de Hacienda Albán  
**Elaborado por:** autores

# PCR



**Diagrama 13:** Resultados P1/P2 y Tb11/Tb12  
**Elaborado por:** autores

# Colonias por temperatura



**Diagrama 14:** Crecimiento de colonias de micobacterias según temperatura de incubación

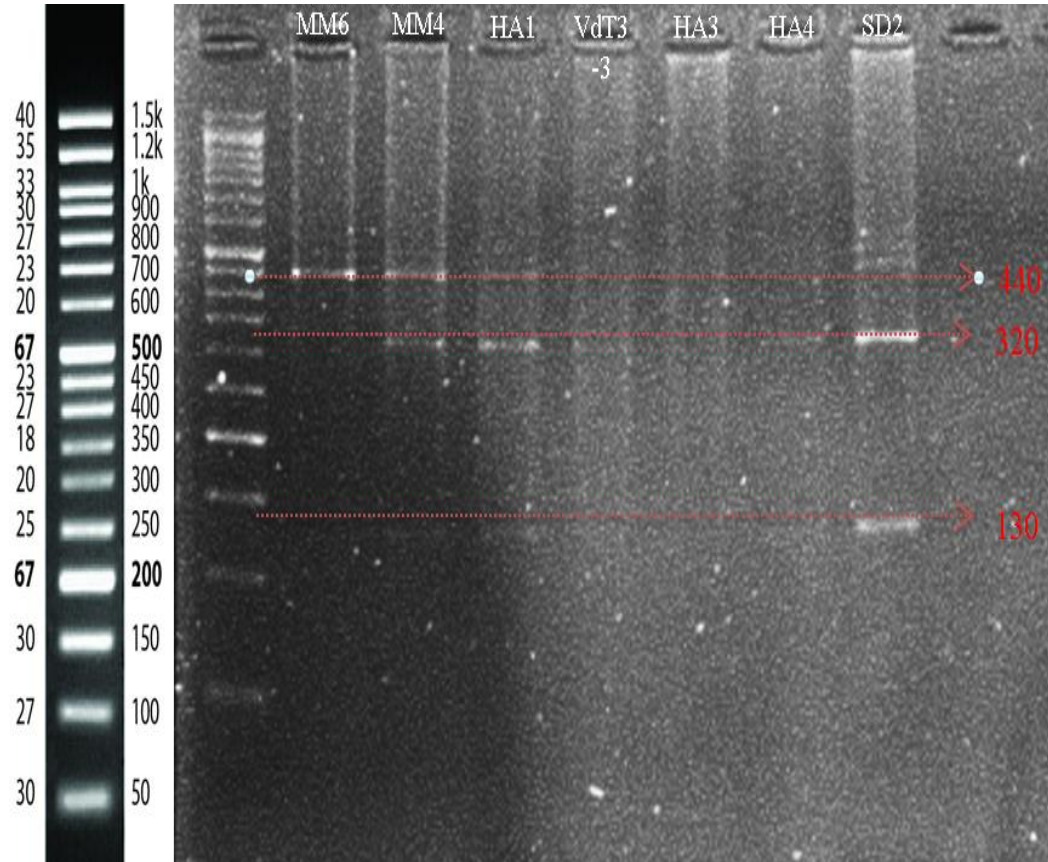
**Elaborado por:** autores



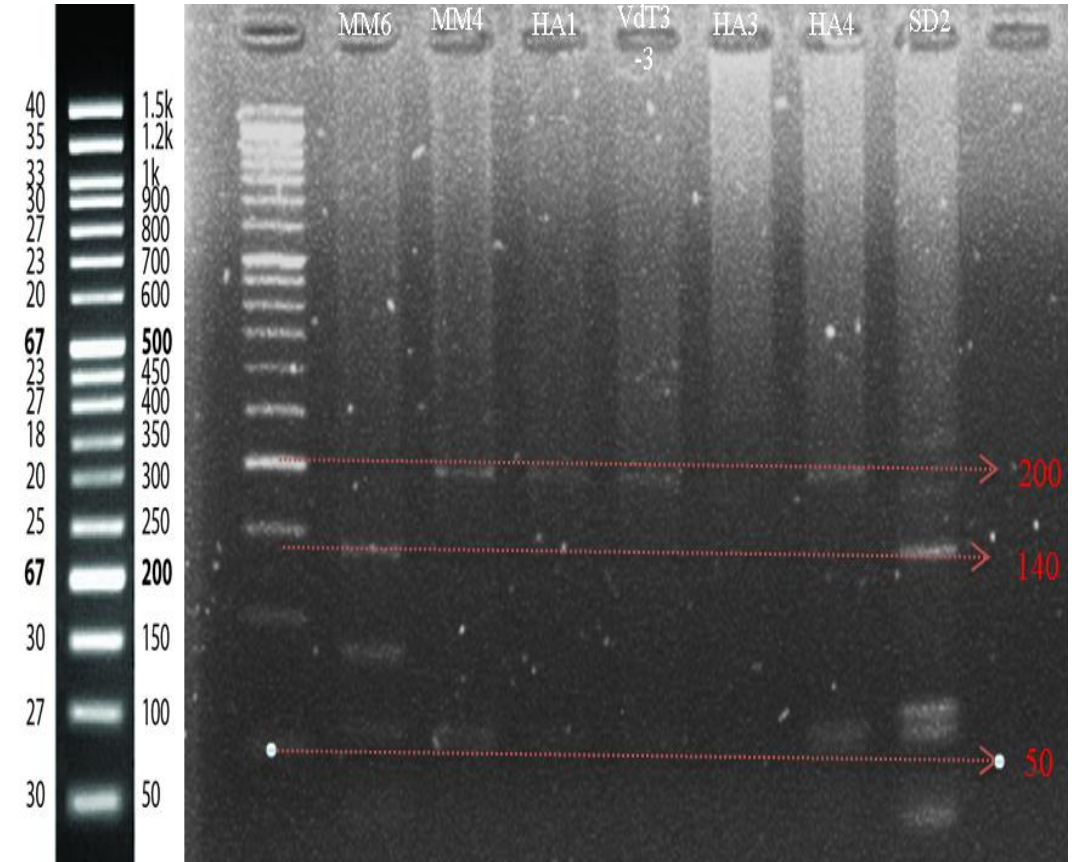
# PCR



ECUADOR  
UNIVERSIDAD  
INTERNACIONAL  
**SEK**  
SER MEJORES



**Diagrama 15: *BstEII***  
**Elaborado por: autores**



**Diagrama 16: *BsuRI (HaeIII)***  
**Elaborado por: autores**



# Especies Halladas



**Tabla 3:** *Especies de micobacterias ambientales aisladas*

| Muestra          | Especie          | BstEII    | HaeIII    | Observaciones del punto de muestreo |
|------------------|------------------|-----------|-----------|-------------------------------------|
| Playayacu        | M. chelonae      | 320/130/0 | 200/60/55 | Zona agrícola y urbana              |
| Santo Domingo 1  | M. mucogenicum   | 320/130/0 | 140/65/60 | Zona ganadera                       |
| Santo Domingo 2  | M. immunogenum   | 320/130/0 | 145/70/60 | Zona ganadera                       |
| Vías del tren 3  | M. chelonae      | 320/130/0 | 200/60/55 | Zona ganadera                       |
| Hacienda Albán 1 | M. chelonae      | 320/130/0 | 200/60/55 | Zona agrícola y ganadera            |
| Hacienda Albán 4 | M. chelonae      | 320/130/0 | 200/60/55 | Zona agrícola y ganadera            |
| María Massache 4 | M. chelonae      | 320/130/0 | 200/60/55 | Zona agrícola y ganadera            |
| María Massache 5 | M. chelonae      | 320/130/0 | 200/60/55 | Zona agrícola y ganadera            |
| María Massache 6 | M. parafortuitum | 440/0/0   | 145/90/60 | Zona agrícola y ganadera            |
| María Massache 7 | M. chelonae      | 320/130/0 | 200/60/55 | Zona agrícola y ganadera            |
| María Massache 8 | M. chelonae      | 320/130/0 | 200/60/55 | Zona agrícola y ganadera            |

**Elaborado por:** autores

# Riqueza



**Tabla 4:** Riqueza según región

| Riqueza según región |        |          |
|----------------------|--------|----------|
| Costa                | Sierra | Amazonía |
| 2                    | 1      | 2        |

*Elaborado por:* autores

**Tabla 5:** Riqueza según piso ecológico

| Riqueza según piso ecológico |                     |
|------------------------------|---------------------|
| Tierras bajas (<600)         | Montano (2000-3000) |
| 4                            | 1                   |

*Elaborado por:* autores

# Conclusiones

- La confirmación de la presencia de micobacterias no tuberculosas (MNT) en muestras de agua del centro-norte del Ecuador pone de manifiesto la existencia de un gran reservorio ambiental de MNT con un importante potencial para ser y convertirse en un serio problema de salud pública.
- El hecho de encontrar crecimiento a temperaturas más bajas de las reportadas en la literatura, demuestra que existen características fenotípicas determinadas previamente y que las condiciones altitudinales y latitudinales del país, así como la influencia de las vertientes andinas aún en tierras bajas tiene una influencia que debe ser considerada determinante.
- Igualmente, la altitud, las más bajas temperaturas promedio, y la radiación UV parece estar influyendo en la baja diversidad de la sierra en contraste con las tierras bajas de las vertientes costa y amazónica.
- La característica de patógenos oportunistas y las condiciones de solapamiento de algunas especies en ambientes de coexistencia con humanos y animales de producción sirve de alerta para el análisis más detallado sobre las posibles consecuencias y patologías que pueden estar subestimándose en zonas como “María Massache” y otras localidades con estas mismas características.

# Bibliografía

- Aitken, A. (2012). *TE buffer (Tris-EDTA buffer)*. London. Retrieved from <https://www.nhm.ac.uk/content/dam/nhmwww/our-science/dpts-facilities-staff/Coreresearchlabs/te-buffer.pdf>
- Alcaide Fernández De Vega, F., Moreno, J. E., González, J., Juan, M., & Palacios Gutiérrez, J. (2005). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Madrid.
- Aldous, W. K., Pounder, J. I., Cloud, J. L., & Woods, G. L. (2005). Comparison of six methods of extracting *Mycobacterium tuberculosis* DNA from processed sputum for testing by quantitative real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(5), 2471–2473. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.5.2471-2473.2005>
- Brunello, F., Ligozzi, M., Cristelli, E., Bonora, S., Tortoli, E., & Fontana, R. (2001). Identification of 54 mycobacterial species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(8), 2799–2806. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.8.2799-2806.2001>
- Hupp, J. R., Ferneini, E. M., Zeller, S., & Ferneini, E. M. (2016). Tuberculosis and Mycobacterial Infections of the Head and Neck. *Head, Neck, and Orofacial Infections*, 416–421. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-28945-0.00031-4>
- Keller, A. P., Beggs, M. L., Amthor, B., Bruns, F., Meissner, P., & Haas, W. H. (2002). Evidence of the presence of IS1245 and IS1311 or closely related insertion elements in nontuberculous mycobacteria outside of the *Mycobacterium avium* complex. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(5), 1869–1872. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.5.1869-1872.2002>
- Lage, R., Biccigo, D. G. Z., Santos, F. B. C., Chimara, E., Pereira, E. S. P., & Da Costa, A. (2015). *Mycobacterium chelonae* cutaneous infection in a patient with mixed connective tissue disease. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 90(1), 104–107. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20152276>

# Bibliografía

- Merck. (2020a). EZ-Fit™ Manifold base, 6-place, stainless steel | EZFITBASE6. Retrieved February 17, 2020, from [https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/EZ-Fit-Manifold-base-6-place-stainless-steel,MM\\_NF-EZFITBASE6?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F](https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/EZ-Fit-Manifold-base-6-place-stainless-steel,MM_NF-EZFITBASE6?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F)
- Merck. (2020b). EZ-Pak Filters 0.45µm 47mm black gridded | MSP000814. Retrieved February 17, 2020, from [https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/EZ-Pak-Filters-0.45m-47mm-black-gridded,MM\\_NF-MSP000814](https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/EZ-Pak-Filters-0.45m-47mm-black-gridded,MM_NF-MSP000814)
- Ministerio de Ambiente del Ecuador. (2012). *Metodología para la Representación Cartográfica de los Ecosistemas del Ecuador Continental*.
- Peto, H. M., Pratt, R. H., Harrington, T. A., LoBue, P. A., & Armstrong, L. R. (2009). Epidemiology of Extrapulmonary Tuberculosis in the United States, 1993–2006. *Clinical Infectious Diseases*, 49(9), 1350–1357. <https://doi.org/10.1086/605559>
- Radomski, N., Lucas, F., Cambau, E., Moulin, L., Haenn, S., & Régis, M. (2008). Programme PIREN-Seine-actions MNT 2008 Développement de méthodes de quantification des mycobactéries non tuberculeuses dans l'eau de la Seine.
- Tortone, C. A., Oriani, D. S., Staskevich, A. S., Oriani, A. S., Gino, L. M., Marfil, M. J., ... Zumárraga, M. J. (2019). Species diversity of non-tuberculous mycobacteria isolated from aquatic environments of General Pico city, Province of La Pampa (Argentina). *Revista Argentina de Microbiología*, 51(3), 259–267. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.08.005>
- Uslu, U., Böhm, O., Heppt, F., & Sticherling, M. (2019). Skin and soft tissue infections caused by mycobacterium chelonae: More common than expected? *Acta Dermato-Venereologica*, 99(10), 889–893. <https://doi.org/10.2340/00015555-3230>