UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y AMBIENTALES

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

"AISLAMIENTO Y GENOTIPIFICACIÓN DE LAS PRIMERAS MICOBACTERIAS AMBIENTALES EN EL CENTRO-NORTE DEL ECUADOR."

Realizado por:

VICTOR EDUARDO MUȘOIU CEDEÑO

Director del proyecto:

Juan Carlos Navarro, Ph. D

Como requisito para la obtención del título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Quito, 18 de febrero de 2020

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, **VICTOR EDUARDO MUȘOIU CEDEÑO**, con cédula de identidad # 1716219108, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.

FIRMA

1716219108

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

"AISLAMIENTO Y GENOTIPIFICACIÓN FILOGENÉTICA DE LAS PRIMERAS MICOBACTERIAS AMBIENTALES EN EL CENTRO-NORTE DEL ECUADOR"

Realizado por:

VICTOR EDUARDO MUȘOIU CEDEÑO

como Requisito para la Obtención del Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

ha sido dirigido por el profesor

JUAN CARLOS NAVARRO

quien considera que constituye un trabajo original de su autor

FIRMA

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

LINO ARISQUETA HERRANZ

JOSÉ RUBÉN RAMÍREZ

Después de revisar el trabajo presentado,

lo han calificado como apto para su defensa oral ante

el tribunal examinador

FIRMA FIRMA

Quito, 18 de febrero de 2020

El presente Trabajo de Fin de Carrera ha sido realizado dentro del Programa de Investigación de la Universidad Internacional SEK denominado:

BIODIVERSIDAD Y RECURSOS NATURALES APLICADOS A LA GESTIÓN AMBIENTAL Y LA BIOTECNOLOGÍA

Perteneciente a la Facultad de Ciencias Naturales y Ambientales.

DEDICATORIA

A mi madre.

AGRADECIMIENTO

A mi familia y amigos por su apoyo incondicional.

Para ser enviado:

To be submitted:

Aislamiento y genotipificación filogenética de las primeras micobacterias ambientales en el centro-norte del Ecuador

Victor Mușoiu Cedeño [1*], Gustavo Echeverría [2*]

, Juan Carlos Navarro [1*],

[1] Universidad Internacional SEK, Facultad de Ciencias Naturales y Ambientales, Quito, Ecuador.

[2] Instituto de Investigación en Zoonosis, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA: Juan Carlos Navarro, Ph. D

Universidad Internacional SEK,

Facultad de Ciencias Ambientales y Naturales, Quito, Ecuador.

Teléfono: +593 (2) 3974800; email: juancarlos.navarro@uisek.edu.ec

Resumen

El presente trabajo realizó un recuento de las micobacterias ambientales en el centro-norte del país, tratando además de establecer posibles correlaciones entre las especies encontradas y factores ambientales (pisos ecológicos y regiones del Ecuador). Con esto, se buscó llenar parcialmente el vacío de información existente en el país en torno a la diversidad de micobacterias ambientales y su relación con episodios micobacteriosis. Así, el hallazgo de especies como *M. chelonae*, *M. parafortuitum*, *M. immunogenum*, y *M. mucogenicum*, todas ellas parásitos oportunistas, en zonas de alta interacción humana y humana-animal quizá pueda ayudar a comprender de mejor manera la dinámica detrás de estos episodios raros, mientras aporta información sobre el comportamiento de las especies de micobacterias del Ecuador en cuanto se refiere a tolerancia a radiación ultravioleta, influencia de la altitud, y afinidad térmica.

Palabras clave: RFLP, salud pública, micobacterias atípicas no tuberculosas, altitud, patógenos oportunistas, factores ambientales.

Abstract

The present work carried out a recount of the environmental mycobacteria in the north-central part of the country, also trying to establish possible correlations between the species found and environmental factors (ecological floors and regions of Ecuador). With this, the void of information existing in the country around the diversity of environmental mycobacteria and their relationship with mycobacteriosis episodes can be completely filled. Thus, the finding of species such as M. chelonae, M. parafortuitum, M. immunogenum, and M. mucogenicum, all of them opportunistic parasites, in areas of high human and human-animal interaction can help to better understand the dynamics behind These rare episodes, while providing information on the behavior of mycobacterial species in Ecuador in terms of tolerance to ultraviolet radiation, the influence of altitude, and thermal affinity.

***Keywords*:** RFLP, public health, atypical nontuberculous mycobacterias, altitude, opportunistic pathogens, environmental factors.

Introducción

El Ecuador es considerado como un país endémico de tuberculosis desde tiempo atrás. El artículo "Tuberculosis in Ecuador" publicado por la revista Nature en 1942 hace eco de ello al referir al puerto de Guayaquil, en aquel entonces con una población de apenas 200 000 habitantes, como el lugar con "la tasa de mortalidad (debida a la tuberculosis) más alta del mundo" (Nature, 1942).

La presencia y alta prevalencia de esta enfermedad, hoy en día, han hecho que el Ecuador conste, según el reporte "Tuberculosis en las Américas, 2018" de la OPS, como uno de los diez países de América con mayor prevalencia de la enfermedad y como el cuarto de la misma región en cuanto a prevalencia de tuberculosis multirresistente (OPS, 2018).

Como es señalado más arriba, la situación en torno a la tuberculosis es grave, pero la de las infecciones causadas por otras micobacterias también lo es. Así se evidencia en el artículo "Global Environmental Nontuberculous Mycobacteria and Their Contemporaneous Man-Made and Natural Niches" de Honda, Virdi, y Chan publicado en 2018, en el que se pone de manifiesto la casi nula investigación realizada en torno a micobacterias atípicas (también conocidas como micobacterias ambientales o no tuberculosas) en Latinoamérica (Honda, Virdi, & Chan, 2018).

Hupp et al., 2016, indica que anualmente se reportan aproximadamente 9,4 millones de casos de infecciones causadas por micobacterias a nivel mundial, de los que 1,1 millones corresponden a pacientes inmunodeprimidos (Hupp, Ferneini, Zeller, & Ferneini, 2016). "La gran mayoría de estas infecciones corresponden a casos de tuberculosis" (World Health Organization, 2018), mas existe un significativo número de

casos relacionados a infecciones por micobacterias atípicas, aproximadamente un quinto del total de infecciones micobacterianas son atribuibles a éstas (Peto, Pratt, Harrington, LoBue, & Armstrong, 2009).

Este grupo de micobacterias, en las que se encuentran agrupadas la mayoría de especies de *Mycobacterium*, están ampliamente distribuidas por el ambiente y se consideran como no patogénicas para la mayoría de personas (Altet Gómez, 2009). Comparten con el resto de micobacterias el ser aerobias, inmóviles, ácido-alcohol (compuesto elaborado a partir de ácido clorhídrico y alcohol etílico) resistentes, y con una pared celular hidrofóbica rica en compuestos lipídicos y sustancialmente más gruesa que las de otras bacterias. Esta pared celular les confiere resistencia a un gran espectro de antibióticos, además de a metales pesados, desinfectantes, temperaturas altas, y pH bajos (Johnson & Odell, 2014).

El estado actual de la investigación en torno a este grupo de bacterias (micobacterias ambientales) es escaso en la región, la cual es considerada la de menor concentración de estos microorganismos. Así, lo demuestran los trabajos previos en el tema que llegan todos a esta misma conclusión y sugieren que se debe probablemente a la escasez de investigaciones sobre este grupo de bacterias en Sudamérica (Halstrom, Price, & Thomson, 2015; Hoefsloot et al., 2013; Honda et al., 2018; Stout, Koh, & Yew, 2016).

En los pocos trabajos en la región, la gran mayoría pertenecen a pacientes humanos y unos pocos a pacientes veterinarios, mientras que existe un vacío total en lo concerniente a muestras ambientales (Halstrom et al., 2015; Hoefsloot et al., 2013; Honda et al., 2018; Stout et al., 2016).

Las características de vida de este grupo de micobacterias (se encuentran principalmente asociadas a cuerpos de agua y suelo, pudiendo estar presente incluso en el agua embotellada y potable) y el hecho de pocas requieren de un hospedador en su ciclo vital implica que mediante esta aproximación metodológica (reporte únicamente de las MNT aisladas de pacientes infectados que presentan síntomas clínicos) puede estarse subestimando la importancia de este grupo de bacterias, lo que podría repercutir negativamente sobre el desarrollo de políticas públicas sanitarias.

Estas micobacterias, en su mayoría son saprófitas que pueden actuar como parásitos oportunistas en muy pocos casos, por lo que se considera que no suelen presentar un riesgo importante a la salud, pero que pueden afectar en algunos casos a personas de la tercera edad e inmunodeprimidas (Collins & Grange, 2003).

En el presente trabajo se busca llenar parte de este vacío mediante la genotipificación por RFLP de colonias de micobacterias aisladas de varios puntos distribuidos representativamente a través de las tres regiones y los siete diferentes pisos ecológicos (altitudinales) del Ecuador. Éstos dos, tomados como ejes de la investigación para determinar la existencia de posibles relaciones entre ellos, las especies encontradas, y las características de las mismas. Así, se espera que las muestras provenientes de la Costa y Amazonía (tierras bajas, altitud menor a 600 metros) crezcan a 37 °C y las de la Sierra (y resto de pisos altitudinales) crezcan a 29 °C, mayoritariamente.

Así mismo, el hallazgo de especies consideradas como parásitos oportunistas dentro de zonas pobladas planteará la necesidad de investigaciones posteriores en torno al tema para determinar hasta qué punto su presencia ha afectado a los pobladores de esta zona y, si existe, al ganado.

Se plantea la hipótesis de que efectivamente existen micobacterias no tuberculosas en cuerpos de agua del centro-norte del Ecuador.

En cuanto a los objetivos del presente trabajo, éstos son 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), e identificar y tipificar mediante análisis de RFLP las cepas obtenidas.

Métodos

Área de estudio

Las muestras de agua fueron tomadas de varios puntos a lo largo de las tres regiones y pisos ecológicos del Ecuador, buscando una mayor representatividad geográfica del país. Los siguientes cuadros muestran los lugares de muestreo y su clasificación dentro de cada uno de los ejes planteados.

Tabla 1: Puntos de muestreo según región

Puntos de muestreo según región		
Costa	Sierra	Amazonía
Portoviejo, Manabí	Tandapi, Pichincha	Hacienda Albán, Sucumbíos
Quevedo, Los Ríos	El Chaco, Napo	María Massache, Sucumbíos
Patricia Pilar, Los Ríos	Agoyán-S2, Tungurahua	F. Arevalo Bravo, Sucumbíos
La Bramadora, Manabí	Ibarra 1, Imbabura	Limoncocha Puerto, Sucumbíos
Luz de América, Santo Domingo	Ibarra 2, Imbabura	Limoncocha Frente, Sucumbíos
Santo Domingo, Santo Domingo	Coca Cola, Pichincha	Limoncocha Potreros, Sucumbíos
	Uyumbicho, Pichincha	Pishira, Sucumbíos
	H. San Agustín, Pichincha	Playayacu, Sucumbíos
	Cruce de Rieles, Pichincha	T. Hugo Ortiz-S5, Pastaza
	Vías del tren, Pichincha	Santa Clara-S8, Pastaza
	Güitig 1, Pichincha	Vía Misahualli 1-S10, Napo
	Güitig 2, Pichincha	Vía Misahualli 2-S13, Napo
	Hda. Santa Beatriz, Pichincha	Vía Misahualli 3-S16, Napo
	La Mica, Napo	Cotundo-S18, Napo
	Limpiopungo, Cotopaxi	Tena Afueras-S20, Napo
	Cotopaxi, Cotopaxi	Tena Centro-S21, Napo
	Antisana, Napo	
	Policía 1, Pichincha	
	Policía 2, Pichincha	

Elaborado por: autores

La clasificación según piso ecológico es la utilizada por el Ministerio de Ambiente (adjunta en el "Anexo 1" del presente trabajo)

Tabla 2: Puntos de muestreo según piso ecológico

Puntos de muestreo según piso ecológico						
Tierras bajas (<600)	Montano bajo (600-2000)	Montano (2000-3000)	Montano alto (3000-3700)	Montano alto superior (3700-4300)	Subnival (4300-4500)	Nival (>4500)
Portoviejo, Manabí	Tandapi, Pichincha	Ibarra 1, Imbabura	Güitig 1, Pichincha	La Mica, Napo	Cotopaxi, Coto.	Antisana, Nap.
Quevedo, Los Ríos	El Chaco, Napo	Ibarra 2, Imbabura	Güitig 2, Pichincha	Limpiopungo, Coto.		
Patricia P, Los Ríos	Agoyán-S2, Tung.	Coca Cola, Pich.	H. S. B., Pichincha			
La Bramadora, Manabí		Uyumbicho, Pich.				
Luz de A., SD		H. S. A, Pichincha				
S. D., SD		C. de R., Pichincha				
H. A., Sucumbíos		V. del tren, Pich.				
M. M., Sucumbíos		Policía 1, Pichincha				
F. A. B., Sucumbíos		Policía 2, Pichincha				
L. P., Sucumbíos						
L. F., Sucumbíos						
L. Pot., Sucumbíos						
Pishira, Sucumbíos						
Playayacu, Sucumbíos						
T.H.O.-S5, Pastaza						
S.C.-S8, Pastaza						
V.M.1-S10, Napo						
V.M.2-S13, Napo						
V.M.3-S16, Napo						
Cotundo-S18, Napo						
Tena A-S20, Napo						
Tena C-S21, Napo						

Elaborado por: autores

Nomenclatura: *Portoviejo:* Fuerte Militar "Manabí" - Portoviejo, *Quevedo:* Rey Leche-Quevedo, *Patricia Pilar:* Rey Leche-Patricia Pilar, *La Bramadora:* Rey Leche-La Bramadora, *Luz de A.:* Rey Leche-Luz de América, *S. D.:* Santo Domingo, Tandapi, El Chaco, Uyumbicho, *H. S. A.*: Hacienda San Agustín, Coca-Cola, Güitig 1-Río, Güitig 2-Hda. Los Diques, *C. de R.:* Cruce de Rieles, *V. del tren:* Vías del tren, *H. S. B.*: Hacienda Santa Beatriz, Cotopaxi, Laguna Limpiopungo, Antisana, *La Mica:* Laguna Micacocha, *F. A. B.:* Familia Arévalo Bravo, *H. A.:* Hacienda Albán, *M. M.:* María Massache, *L. P.:* Limoncocha Puerto, *L. F.:* Limoncocha Frente, *L. Pot.:* Limoncocha Potreros, Pishira, Playayacu, Ibarra 1 y 2, Agoyán (S2), *T. H. O:* Teniente Hugo Ortiz (S5), *S. C.:* Santa Clara (S8), *V. M. 1:* Vía Misahualli 1 (S10), *V. M. 2:* Vía Misahualli 2 (S13), *V. M.3:* Vía Misahualli 3 (S16), Cotundo (S18), *Tena A-S20:* Tena Afueras (S20), *Tena C-S21:* Tena Centro (S21), *Tung:* Tungurahua, *Nap:* Napo, *Coto:* Cotopaxi, *Pich:*Pichincha

Para el muestreo se siguió la metodología establecida por Tortone et al, 2019, que se basa en la recolección de muestras simples al azar en envases estériles. Las muestras se obtienen al introducir el envase estéril cerrado al cuerpo de agua, una vez sumergido éste se abre la tapa y se llena completamente para evitar el ingreso de aire que pueda alterar la muestra hasta su análisis. Todas las zonas de toma de muestra presentaban poca profundidad y escasa corriente para garantizar que existiese una fracción de sedimento (al que pueden estar asociadas las micobacterias) dentro de la muestra (Tortone et al., 2019).

Durante el tiempo de transporte y almacenamiento las muestras fueron mantenidas a temperaturas menores a 4 °C.

Los puntos de muestreo fueron seleccionados por su representatividad en cuanto a pisos ecológicos y regiones del Ecuador se refiere. La mayoría de los mismos pertenecen a zonas de constante interacción humana y humana-animal, por lo que se consideran como nichos probables de micobacterias atípicas que pueden llegar a ser parásitos oportunistas.

En todas las zonas menos subnival y nival las muestras fueron tomadas de cuerpos de agua asociados a intensa actividad antrópica. En las zonas de Machachi, Tandapi y Santo Domingo-Quevedo las muestras fueron tomadas de acequias ganaderas (a excepción del punto denominado Coca-Cola, el cual fue tomado de un caño situado al frente de la factoría del mismo nombre y que transporta aguas residuales provenientes de Machachi y sus alrededores). En Ibarra y la Amazonía, por otro lado, éstas fueron tomadas de acequias y ríos próximos a zonas de uso principalmente agrícola (algunas poseían ganadería incipiente, a baja escala). En Portoviejo y Tena las muestras fueron tomadas en tramos de río que atraviesan la ciudad.

En zonas de alta radiación UV (subnival y nival) se procuró tomar muestras de zonas bajo sombra, ya que este tipo de microorganismos (micobacterias) poseen escasa tolerancia a la radiación (Alcaide Fernández De Vega, Moreno, González, Juan, & Palacios Gutiérrez, 2005).

Preparación de medios de cultivo

Para el cultivo y aislamiento de micobacterias ambientales se siguió el protocolo establecido por Radomski et al, 2008, el cual hace uso del medio de cultivo generalista TSA (Tryptone Soy Agar) suplementado con el conjunto de antibióticos PANTA (Polimixina, Ácido nalidíxico, Trimetroprim, Azlocilina, y Anfotericina B) y glicerol para tales fines y que requiere la filtración previa de las muestras con membranas Millipore de 0,45 µm (Radomski et al., 2008).

En cajas Petri de 60x15 mm se colocó el medio selectivo TSA con PANTA y glicerol a concentraciones de 30 g/L de TSA, 5 000 µg/mL de Polimixina, 2 mg/mL Ácido nalidíxico, 0,5 mg/mL Trimetroprim, 1 µg/mL Azlocilina, 0,5 mg/mL Anfotericina B, y 1% de glicerol (como fuente alterna de carbono).

El medio de cultivo TSA (Tryptone Soy Agar) es de uso generalista. Sus aplicaciones en la microbiología son extensas y variadas, según el proveedor Sigma-Aldrich en su entrada digital del producto, indica que éste puede ser usado para el "*cultivo y aislamiento de microorganismos, mantenimiento de cultivos stock, y precultivo y conteo de E. coli, además de ser apto para el cultivo de microorganismos aerobios y anaerobios"* (Sigma-Aldrich, 2020)

Este medio tiene como fuente de carbono los azucares derivados de la digestión de la soya (principalmente en forma de glucosa), como fuente de aminoácidos,

nitrógeno, vitaminas y minerales la peptona proveniente de la caseína y la soya, mientras que el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico (Sigma-Aldrich, 2020).

Debido a que algunas especies de micobacterias no utilizan la glucosa como fuente de carbono (o al menos, no como fuente única) se requiere la adición de glicerol.

Pretratamiento

Antes de filtrar las muestras se requiere un pretratamiento para reducir la carga bacteriana. Este se realizó con el compuesto de amonio cuaternario HPC (1-Hexadecylpyridinium Chloride), disolviéndolo a una concentración del 0,005% en las muestras y con tiempo de acción de 20 minutos.

Este compuesto es un descontaminante de uso común desde hace mucho para el aislamiento de micobacterias (Corner & Trajstman, 1988). Este método de descontaminación es más efectivo para el aislamiento de micobacterias en comparación con métodos tradicionales como el hidróxido de sodio o el ácido sulfúrico (Ambrosio, Oliveira, Rodriguez, Neto, & Amaku, 2008).

Filtración

Tras este pretratamiento y la esterilización de los materiales partícipes se realizó la filtración al vacío de las muestras con membranas Millipore de 0,45 µm (Sigma-Aldrich, 2020).

La filtración al vacío se la realizó en una rampa de filtración para 6 vasos y con la ayuda de un compresor de aire.

Siembra

Una vez la filtración se completó, las membranas se colocaron sobre los medios de cultivo de forma que la zona expuesta al agua durante la fase previa esté en contacto con el medio de cultivo.

La incubación de los medios se los realizó a dos temperaturas 29 °C (temperatura a la que crecen algunas micobacterias atípicas como *M. ulcerans* o *M. haemophilum*) y 37 °C (temperatura considerada como óptima para el crecimiento de la mayoría de las micobacterias) (Alcaide Fernández De Vega et al., 2005).

Tras un periodo de incubación de 48 horas las membranas Millipore se retiraron y los medios de cultivo permanecieron en incubación durante 12 semanas a sus respectivas temperaturas. Tiempo establecido para el cultivo de *M. ulcerans* y *M. genavense*, consideradas como las micobacterias de más lento crecimiento tras *M. leprae*, la cual requiere obligatoriamente de cultivos celulares para su crecimiento (Alcaide Fernández De Vega et al., 2005).

Procesamiento de colonias bacterianas

En los medios de cultivo en los que se evidenció crecimiento bacteriano se realizó tinción Ziehl-Neelsen (procedimiento común para la determinación microscópica de micobacterias) y transferencia de un ápice de la colonia a un tubo TE (Tris-EDTA) (Alcaide Fernández De Vega et al., 2005).

La tinción Ziehl-Neelsen permite la diferenciación de micobacterias haciendo uso de las características de la pared celular de estos organismos que forman *"complejos estables con ciertos colorantes arilmetanos como la fucsina o la auramina O"* e imposibilitan la eliminación del colorante tras la exposición a alcohol ácido (ompuesto elaborado a partir de ácido clorhídrico y alcohol etílico), propiedad

denominada ácido-alcohol resistencia (Alcaide Fernández De Vega et al., 2005). En el examen microscópico las muestras consideradas como positivas mediante esta tinción evidencian la presencia de bacilos fucsias que contrastan con otras bacterias no ácido-alcohol resistentes que se muestran en teñidas de azul de metileno.

Aislamiento de ADN

Para la obtención del ADN de las colonias se tomó un fragmento de las mismas y se colocó en buffer TE (Tris-EDTA), el cual es una solución de uso común en procedimientos de biología molecular relacionados a ADN y ARN. Este buffer busca solubilizar estos ácidos nucleicos a la vez que los preserva, evitando su degradación (Aitken, 2012).

Los tubos TE resultantes del procedimiento anterior fueron utilizados para la extracción de ADN mediante *boiling*. Método común para la extracción de ADN y que se adecúa a las necesidades requeridas por la investigación (Aldous, Pounder, Cloud, & Woods, 2005).

El protocolo de boiling utilizado es el establecido por Echeverría et al, 2019, que consta de la aplicación de un baño María a 100 °C a las muestras durante 10 minutos. De esta forma el material genético queda disponible como sobrenadante (Abdulsamad, Dashti, & Jadaon, 2009; Echeverría et al., 2019).

Genotipificación

Las muestras de ADN fueron sometidas a una primera prueba para determinar si pertenecen al género *Mycobacterium*, en la que se usaron los primers P1 (5′-ACA ACA GAT CTC AGC AAA T-3′) y P2 (5′-CTA TTG CTT GAT TGT CAC C-3′). Éstos están

direccionados a una zona altamente conservada codificante para 16S rRNA de este género de bacterias (Keller et al., 2002).

Posteriormente, y siguiendo el protocolo establecido por Telenti et al, 1993, se utilizaron las muestras positivas de la PCR P1/P2 para una nueva PCR con los primers Tb11 (5′-ACCAACGATGGTGTGTCCAT) y Tb12 (5′-CTTGTCGAACCGCATACCCT). Estos primers amplifican una zona del gen codificante para la proteína de shock térmico 65, *hsp65*, común a todas las micobacterias. Este gen es encuentra altamente conservado dentro del género *Mycobacterium*, pero presenta variaciones suficientes como para ser utilizado en la diferenciación entre especies (Brunello et al., 2001; Telenti et al., 1993).

La PCR Tb11/Tb12 está direccionada principalmente a amplificar el fragmento de 429 pb utilizado en la digestión con BstEII y BsuRI (HaeIII), digestión que permite la identificación a través del análisis de RFLP. Además, la electroforesis realizada tras esta PCR permite identificar los amplicones aptos para continuar el proceso.

Siguiendo el protocolo establecido por Telenti et al., 1993, se incubó la mezcla de muestra con cada una de las enzimas de restricción a 60 °C BstEII y 37 °C BsuRI (HaeIII) durante 60 minutos (Telenti et al., 1993).

Finalmente, la electroforesis correspondiente a las digestiones con estas enzimas de restricción mostró un patrón de fragmentos que permitió la identificación de las especies de micobacterias a la que pertenecen mediante la aplicación del algoritmo para identificación de especies de micobacterias por PRA (PCR RFLP Analysis) denominado “PRA-site” desarrollado por CHUV, Federal University of Sao Paulo, Adolfo Lutz Institute, Institut Pasteur y Swiss National Center for Mycobacteria (http://app. chuv. ch/prasite/index.html).

Resultados

En la "Tabla 3" organizan los resultados encontrados, excluyendo la etapa del PRA.

Tabla 3: Resumen de resultados según punto de muestreo

Región	Punto	Piso ecológico	Colonias	Crecimiento según temperatura de incubación		Ziehl Neelsen		PCR*		Observaciones
				29 °C	37 °C	29 °C	37 °C	29 °C	37 °C	
Costa	Portoviejo	Tierras bajas (<600)		No	No					Zona urbana
	Quevedo	Tierras bajas (<600)		No	No					Zona ganadera
	Patricia Pilar	Tierras bajas (<600)		No	No					Zona ganadera
	La Bramadora	Tierras bajas (<600)		No	No					Zona ganadera
	Luz de América	Tierras bajas (<600)		No	No					Zona ganadera
	Santo Domingo	Tierras bajas (<600)	1	Sí	No	Sí		Sí		Zona ganadera
			2	Sí	No	Sí		Sí		
Sierra	Tandapi	Montano bajo (600-2000)		No	No					Zona ganadera
	El Chaco	Montano bajo (600-2000)		No	No					Zona agrícola y ganadera
	Agoyán-S2	Montano bajo (600-2000)		No	No					Zona agrícola
	Ibarra 1	Montano (2000-3000)	1	Sí	No	No		No		Zona agrícola
			2	Sí	No	No		No		
			3	Sí	No	Sí		Sí		
	Ibarra 2	Montano (2000-3000)	1	Sí	No	Sí		No		Zona agrícola
			2	Sí	No	Sí		Sí		
			3	Sí	No	No		No		
	Coca Cola	Montano (2000-3000)	1	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Zona urbana
			2	Sí	Sí	No	No	No	Sí	
			3	Sí	Sí	No	Sí	Sí	Sí	
	Uyumbicho	Montano (2000-3000)		No	No					Zona urbana
	H. San Agustín	Montano (2000-3000)		No	No					Zona ganadera
	Cruce de Rieles	Montano (2000-3000)	1	Sí	No	Sí		No		Zona ganadera
			2	Sí	No	No		No		
	Vías del tren	Montano (2000-3000)	1	Sí	No	Sí		Sí		Zona ganadera
			2	Sí	No	No		Sí		
			3	Sí	No	Sí		Sí		
	Policía 1	Montano (2000-3000)		Sí	No	Sí		No		Zona ganadera

Continúa en la siguiente página

Región	Punto	Piso ecológico	Colonias	Crecimiento según temperatura de incubación		Ziehl Neelsen		PCR		Observaciones
				29 °C	37 °C	29 °C	37 °C	29 °C	37 °C	
Sierra	Policía 2	Montano (2000-3000)	1	Sí	No	No		No		Zona ganadera
			2	Sí	No	Sí		No		
			3	Sí	No	No		No		
	Güitig 1	Montano alto (3000-3700)		Sí	No	Sí		No		Zona ganadera
	Güitig 2	Montano alto (3000-3700)		No	No					Zona ganadera
	Hda. Santa Beatriz	Montano alto (3000-3700)		Sí	No	Sí		No		Zona ganadera
	La Mica	Montano alto superior (3700-4300)		Sí	No	Sí		Sí		Zona no intervenida
	Limpiopungo	Montano alto superior (3700-4300)		Sí	No	No		No		Zona no intervenida
	Cotopaxi	Subnival (4300-4500)		No	No					Zona no intervenida
	Antisana	Nival (>4500)		No	No					Zona no intervenida
Amazonía	Hacienda Albán.	Tierras bajas (<600)	1	Sí	No	Sí		Sí		Zona agrícola y ganadera
			2	Sí	No	Sí		Sí		
			3	Sí	No	No		Sí		
			4	Sí	No	Sí		Sí		
	María Massache	Tierras bajas (<600)	1	Sí	No	Sí		Sí		Zona agrícola y ganadera
			2	Sí	No	Sí		Sí		
			3	Sí	No	Sí		Sí		
			4	Sí	No	Sí		Sí		
			5	Sí	No	Sí		Sí		
			6	Sí	No	No		Sí		
			7	Sí	No	Sí		Sí		
			8	Sí	No	No		Sí		
	F. Arevalo Bravo	Tierras bajas (<600)		Sí	No	No		No		Zona agrícola y ganadera
	Limoncocha Puerto	Tierras bajas (<600)		No	No					Zona agrícola y urbana
	Limoncocha Frente	Tierras bajas (<600)		No	Sí		No		No	Zona agrícola y urbana
	Limoncocha Potreros	Tierras bajas (<600)		Sí	No	Sí		No		Zona ganadera
	Pishira	Tierras bajas (<600)		No	No					Zona agrícola y urbana

Continúa en la siguiente página

Región	Punto	Piso ecológico	Colonias	Crecimiento según temperatura de incubación		Ziehl Neelsen		PCR		Observaciones
				29 °C	37 °C	29 °C	37 °C	29 °C	37 °C	
Amazonía	Playayacu	Tierras bajas (<600)		Sí	No	Sí		Sí		Zona agrícola y urbana
	T. Hugo Ortiz-S5	Tierras bajas (<600)		No	No					Zona agrícola y ganadera
	Santa Clara-S8	Tierras bajas (<600)		Sí	No	Sí		No		Zona agrícola y ganadera
	Vía Misahualli 1-S10	Tierras bajas (<600)		No	No					Zona agrícola y ganadera
	Vía Misahualli 2-S13	Tierras bajas (<600)		No	No					Zona agrícola y ganadera
	Vía Misahualli 3-S16	Tierras bajas (<600)	1	Sí	Sí	No	Sí	No	No	Zona agrícola y ganadera
			2	Sí	Sí	Sí	No	No	No	
	Cotundo-S18	Tierras bajas (<600)		No	No					Zona agrícola y ganadera
	Tena Afueras-S20	Tierras bajas (<600)	1	Sí	No	No		No		Zona urbana
			2	Sí	No	No		No		
	Tena Centro-S21	Tierras bajas (<600)		Sí	No	Sí		Sí		Zona urbana

Elaborado por: autores

*PCR: amplificación de P1/P2 para determinación de pertenencia al género *Mycobacterium*

De las muestras analizadas se encontró crecimiento en 21 puntos de los 41 muestreados (51%). Según región, se halló que en la Sierra hubo crecimiento en 11 de los 19 puntos muestreados (58%), en la Costa en 1 de los 6 (17%), y en la Amazonía en 9 de los 16 (52 %).

Según piso ecológico, existió crecimiento en 10 de los 22 (46%) puntos de muestreo correspondientes a Tierras bajas, en 7 de los 9 (78%) de zona Montana, 2 de los 3 (67%) de zona Montana alta, y en los 2 (100%) de la zona Montana alta superior. En las zonas Montana baja, subnival, y nival no se registró crecimiento.

De estos 21 puntos en los que existió crecimiento se identificaron 51 colonias, de las que casi todas fueron obtenidas de medios incubados a 29 °C, 45 (88%). Las

únicas 6 colonias obtenidas a 37 °C fueron aisladas de 3 puntos; Coca-Cola, Limoncocha Frente y Vía Misahualli 3-S16. Los dos últimos corresponden a Tierras bajas con temperaturas elevadas, por lo que su presencia va acorde a lo esperado.

La microscopía de las muestras sometidas a tinción Ziehl-Neelsen evidenció la presencia de 32 positivos (67%) y 19 negativos. Mientras que las pruebas moleculares para P1/P2 estimaron que 24 (47%) de las 51 muestras pertenecían al género *Mycobacterium*. En el "Anexo 4" se muestran los geles.

En estas 24 muestras se realizó la determinación de la presencia del segmento Tb11/Tb12 de *hsp65*, obteniéndose 11 positivos y 13 negativos. En el "Anexo 5" se muestran los geles.

A continuación, en la Tabla 4 se muestran las especies encontradas.

Tabla 4: Micobacterias no tuberculosas 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

M. chelonae: Mycobacterium chelonae, M. mucogenicum: Mycobacterium mucogenicum, M. immunogenum: Mycobacterium immunogenum, M. parafortuitum: Mycobacterium parafortuitum

En el "Anexo 6" se muestran los geles de las digestiones con BstEII y HaeIII.

Discusión

Se pudo confirmar la presencia de MNT (micobacterias no tuberculosas) en muestras de agua en el centro-norte del Ecuador, confirmando así la hipótesis general de trabajo planteada. La determinación molecular mediante P1/P2 arrojó 24 colonias positivas para pertenencia al género *Mycobacterium*, corroborando lo antes planteado.

La confirmación de la presencia de MNT en muestras de agua (ambientales) plantea la existencia de una importante fuente de patógenos oportunistas que pueden ser los responsables de los casos de micobacteriosis reportados en el país, así como de una gran cantidad de infecciones no reportadas en pacientes humanos y veterinarios.

Al respecto de estos, la presencia de estas MNT permite cerrar el ciclo de contagio en el ganado, ya que la mayoría de estas micobacterias aisladas fueron obtenidas de acequias próximas a zonas ganaderas y existe evidencia previa de la presencia de MNT en diferentes muestras obtenidas de ganado (Echeverría, Escobar, Changoluisa, Ron, Proaño, & de Waard, 2019).

El total de las 4 especies halladas (*M. chelonae, M. parafortuitum, M. mucogenicum, M. immunogenum*) pueden actuar como patógenos oportunistas, por lo que investigaciones posteriores se deberían realizar para determinar el nivel de impacto que tiene la presencia de estas MNT sobre la población humana y animal de la zona (Cooper, 1989; Lai, Tan, Chen, & Hsueh, 2009; Pradier et al., 2018; Wallace, Zhang, Wilson, Mann, & Rossmoore, 2002).

Mycobacterium chelonae fue la especie más ubicua y común hallada en la presente investigación (8 de las 11 cepas analizadas mediante PRA). Esta especie resulta

relevante por su condición de parásito oportunista, Cooper menciona que este microorganismo *"está comúnmente asociado a infecciones cutáneas y de tejidos blandos, especialmente en extremidades"*. Además cita que éste puede *"ocasionar infecciones post-operatorias tras la realización de implantes, trasplantes, o uso de inyecciones"* (Cooper, 1989).

Como *M. chelonae*, también son parásitos oportunistas las demás micobacterias halladas en este trabajo; *M. parafortuitum, M. mucogenicum, M. immunogenum.* La primera es una micobacteria también bastante extendida (presente en suelo, agua, exudados nasales de bovinos, y esputos de pacientes), y ha sido reportada como un patógeno solo en infecciones humanas previas, por lo que su papel como patógeno oportunista es debatido (Lai et al., 2009; Saad, Levasseur, & Drancourt, 2018). *M. mucogenicum* es también un microorganismo ubicuo que ha sido relacionado a infecciones intrahospitalarias, principalmente en pacientes inmunodeprimidos (Pradier et al., 2018). *M. immunogenum* es una bacteria que ha sido asociada al surgimiento de alveolitis alérgicas en trabajadores de la industria metalúrgica (Wallace et al., 2002).

La presencia de estas micobacterias es preocupante así como el medio en el que se encuentran, ya que todos estos cuerpos de agua están en constante interacción con humanos y animales relacionados a éstos. El punto de mayor interés, probablemente sea "María Massache", ya que reporta la presencia de *M. chelonae* y *M. parafortuitum* y el cuerpo de agua del que fue tomada la muestra abastece de agua para el ganado y distintas actividades humanas a las personas de esta propiedad y de varias en la zona.

En cuanto a las variables ambientales, siendo las regiones y los pisos altitudinales dos variables íntimamente relacionadas (todos los puntos tomados en la Costa y Amazonía corresponden a "Tierras bajas", altitud menor a 600 msnm), por lo que los hallazgos resultan bastante similares.

Así lo demuestra el hecho que se encontró una mayor riqueza de especies en Tierras bajas (4 especies), en contraposición a la única especie encontrada en la zona Montana. Mientras que la riqueza en la Costa y la Amazonía fue semejante entre ambas regiones (2 especies) y mayor a la hallada en la Sierra (1 especie).

La altitud (piso ecológico) interfiere sobre el crecimiento de estos microorganismos. La ausencia de formación de colonias en los medios correspondientes a muestras tomadas de zonas nivales y subnivales es muestra de ello y se puede explicar por los altos niveles de radiación UV que suelen recibir estas zonas. Las micobacterias, a pesar de su alta tolerancia a la desecación, congelación, y un amplio espectro de antibióticos, "*deben permanecer al abrigo de la luz del sol, ya que los rayos ultravioletas son letales para los mismos"* (Alcaide Fernández De Vega et al., 2005).

Finalmente, cabe señalar la predominancia de micobacterias crecidas a 29 °C (21 de las 24 colonias aisladas confirmadas como micobacterias por P1/P2, 88%). Este hallazgo, resulta llamativo, ya que según reporta Alcaide Fernández de Vega et al., 2005, para micobacterias "la temperatura óptima de crecimiento general suele ser de 35-37°C", pero en el presente trabajo no se pudieron identificar especies de crecimiento correspondiente a esta temperatura (los 3 aislamientos a 37°C confirmados como micobacterias mediante P1/P2 tuvieron que ser secuenciados debido a la imposibilidad de identificación por análisis de RFLP) y las 4 especies encontradas todas poseen temperaturas de incubación óptima entre los 28°C y 30°C. Este resultado muestra que existen posibles adaptaciones a los diferentes pisos ecológicos en el país (Alcaide Fernández De Vega et al., 2005; Conville & Witebsky, 2001; Cooper, 1989).

Resumen de resultados

- 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.
- Las Tierras bajas fue el piso que presentó mayor riqueza de especies (4 especies) de los pisos ecológicos evaluados.
- La Costa y la Amazonía presentaron una riqueza de especies semejante y mayor a la de la Sierra.
- Se evidencia una clara predominancia de especies de micobacterias con preferencia por temperaturas más bajas que las habituales para organismos de este género (las 4 especies encontradas poseen temperaturas de incubación óptima entre los 28°C y 30°C).
- Todas las especies halladas son consideradas como parásitos oportunistas que pueden habitar un gran espectro de ambientes (suelo, agua, ganado, humanos).
- El punto de muestreo que genera mayor preocupación debido a las condiciones de la zona (alto nivel de interacción humano-animal y uso generalizado de uso del agua de la acequia para animales y labores domésticas) es "María Massache." Las micobacterias encontradas pueden causar infecciones a cualquier paciente inmunológicamente vulnerable.

Conclusiones

Esta investigación representa la primera aproximación a la identificación de MNT ambientales en Ecuador con la identificación de cuatro especies de micobacterias que se presentan predominantemente en tierras bajas de la Amazonía y Costa del país. 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.

Finalmente, se abre una línea de investigación eco-epidemiológica sobre MNT que debe profundizar sobre la caracterización en la diversidad fenotípica, genotípica y las relaciones ecológicas de dichos organismos y su posible influencia en patologías en humanos cuyo origen es desconocido en muchas áreas del país.

Literatura citada

Abdulsamad, A., Dashti, A., & Jadaon, M. (2009). Heat Treatment of Bacteria: A Simple Method of DNA Extraction for Molecular Techniques. *Kuwait Medical Journal*, *41*(2), 117–122.

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

Altet Gómez, N. (2009). Non-tuberculous mycobacteria: An emerging disease? *Anales de Pediatria*, *71*(3), 185–188. https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2009.07.001

Ambrosio, S. R., Oliveira, E. M. D. D., Rodriguez, C. A. R., Neto, J. S. F., & Amaku, M. (2008). Comparison of three decontamination methods for Mycobacterium bovis isolation. *Brazilian Journal of Microbiology*, *39*(2), 241–244. https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000200008

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

Conville, P. S., & Witebsky, F. G. (2001). Lack of Usefulness of Carbon Utilization Tests for Identification of Mycobacterium mucogenicum. *Journal of Clinical Microbiology*, *39*(7), 2725–2728. https://doi.org/10.1128/jcm.39.7.2725-2728.2001

Cooper, J. F. (1989). Mycobacterium chelonae. *Infectious Diseases Newsletter*, *8*(9), 70–71. https://doi.org/10.1016/0278-2316(89)90038-8

Corner, L. A., & Trajstman, A. C. (1988). An evaluation of 1-hexadecylpyridinium chloride as a decontaminant in the primary isolation of Mycobacterium bovis from bovine lesions. *Veterinary Microbiology*, *18*(2), 127–134. https://doi.org/10.1016/0378-1135(88)90058-2

Echeverría, G., Escobar, H., Changoluisa, D., Ron, L., Proaño, A., Proaño-Pérez, F., …

Waard, J. H. de. (2019). Prevalence of Paratuberculosis in Dairy Cattle in Ecuador. *International Journal of Mycobacteriology*.

Halstrom, S., Price, P., & Thomson, R. (2015). Review: Environmental mycobacteria as a cause of human infection. *International Journal of Mycobacteriology*, *4*(2), 81–91. https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2015.03.002

Hoefsloot, W., van Ingen, J., Andrejak, C., Ängeby, K., Bauriaud, R., Bemer, P., … Nontuberculous Mycobacteria Network European Trials Group. (2013). The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study. *European Respiratory Journal*, *42*(6), 1604–1613. https://doi.org/10.1183/09031936.00149212

Honda, J. R., Virdi, R., & Chan, E. D. (2018). Global Environmental Nontuberculous Mycobacteria and Their Contemporaneous Man-Made and Natural Niches. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 2029. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02029

Johnson, M. M., & Odell, J. A. (2014). Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. *Journal of Thoracic Disease*. Pioneer Bioscience Publishing. https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2013.12.24

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

Lai, C. C., Tan, C. K., Chen, C. C., & Hsueh, P. R. (2009). Mycobacterium neoaurum infection in a patient with renal failure. *International Journal of Infectious Diseases*, *13*(5). https://doi.org/10.1016/j.ijid.2008.11.001

Ministerio de Ambiente del Ecuador. (2012). *Metodología para la Representación*

Cartográfica de los Ecosistemas del Ecuador Continental.

Nature. (1942). Tuberculosis in Ecuador. *Nature*. https://doi.org/10.1038/149498a0

OPS. (2018). *Tuberculosis en las Américas, 2018*. Washington D.C. Retrieved from www.paho.org

Pradier, M., Boucher, A., Robineau, O., Chachaty, E., Meybeck, A., & Senneville, E. (2018). Mycobacterium mucogenicum bacteremia: Major role of clinical microbiologists. *BMC Infectious Diseases*, *18*(1). https://doi.org/10.1186/s12879-018-3545-3

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.

Saad, J., Levasseur, A., & Drancourt, M. (2018). Draft Genome Sequence of Mycobacterium parafortuitum Strain P7335 . *Microbiology Resource Announcements*, *7*(8). https://doi.org/10.1128/mra.00950-18

Sigma-Aldrich. (2020). 22091 Tryptic Soy Agar (Tryptone Soya Agar, TSA, CASO Agar, Soybean Casein digest Agar). Retrieved February 5, 2020, from https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Datasheet/1/22091dat.pdf

Stout, J. E., Koh, W.-J., & Yew, W. W. (2016). Update on pulmonary disease due to non-tuberculous mycobacteria. *International Journal of Infectious Diseases*, *45*, 123–134. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.03.006

Telenti, A., Marchesi, F., Balz, M., Bally, F., Bottger, E. C., & Bodmer, T. (1993). Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, *31*(2), 175–178. https://doi.org/10.1128/jcm.31.2.175-178.1993

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 Microbiologia*, *51*(3), 259–267. https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.08.005

Wallace, R. J., Zhang, Y., Wilson, R. W., Mann, L., & Rossmoore, H. (2002). Presence of a single genotype of the newly described species Mycobacterium immunogenum in industrial metalworking fluids associated with hypersensitivity pneumonitis. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(11), 5580–5584. https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5580-5584.2002

Agradecimientos: Al Instituto de Investigación en Zoonosis (CIZ).

ANEXOS

ANEXO 1

Tabla 9. Equivalencia entre termotipos y pisos ecológicos en los Andes del Norte y Centro

Tabla 1: Equivalencia entre termotipos y pisos ecológicos

en los Andes del Norte y Centro (Ministerio de Ambiente del Ecuador, 2012)

Tabla 9. Equivalencia entre termotipos y pisos ecológicos en los Andes del Norte y Centro.

Termotipos	It	Tp	Pisos ecológicos	Límites altimétricos antes (mínimos y máximos en m)	Límites altimétricos tp (mínimos y máximos en m)	Límites altimétricos ecosist (mínimos y máximos en m)
Criotropical	-	1-450	Subnival	4300-5200	>4370	4300-4500
Orotropical	50-160	450-1050	Montano alto superior	3900-4600	3573-4370	3700-4300
Supratropical	160-320	1050-2100	Montano Alto	2900-4100	2723-4068	3000-3700
Mesotropical	320-490	2100-2700	Montano	1800-3200	1824-3465	2000-3000
Termotropical	490-730	2700-3100	Montano bajo	500-1900	-2294	600-2000
Infratropical	730-890	>3100	Tierras bajas	<500		< 600

ANEXO 2

Mapa Puntos de Muestreo

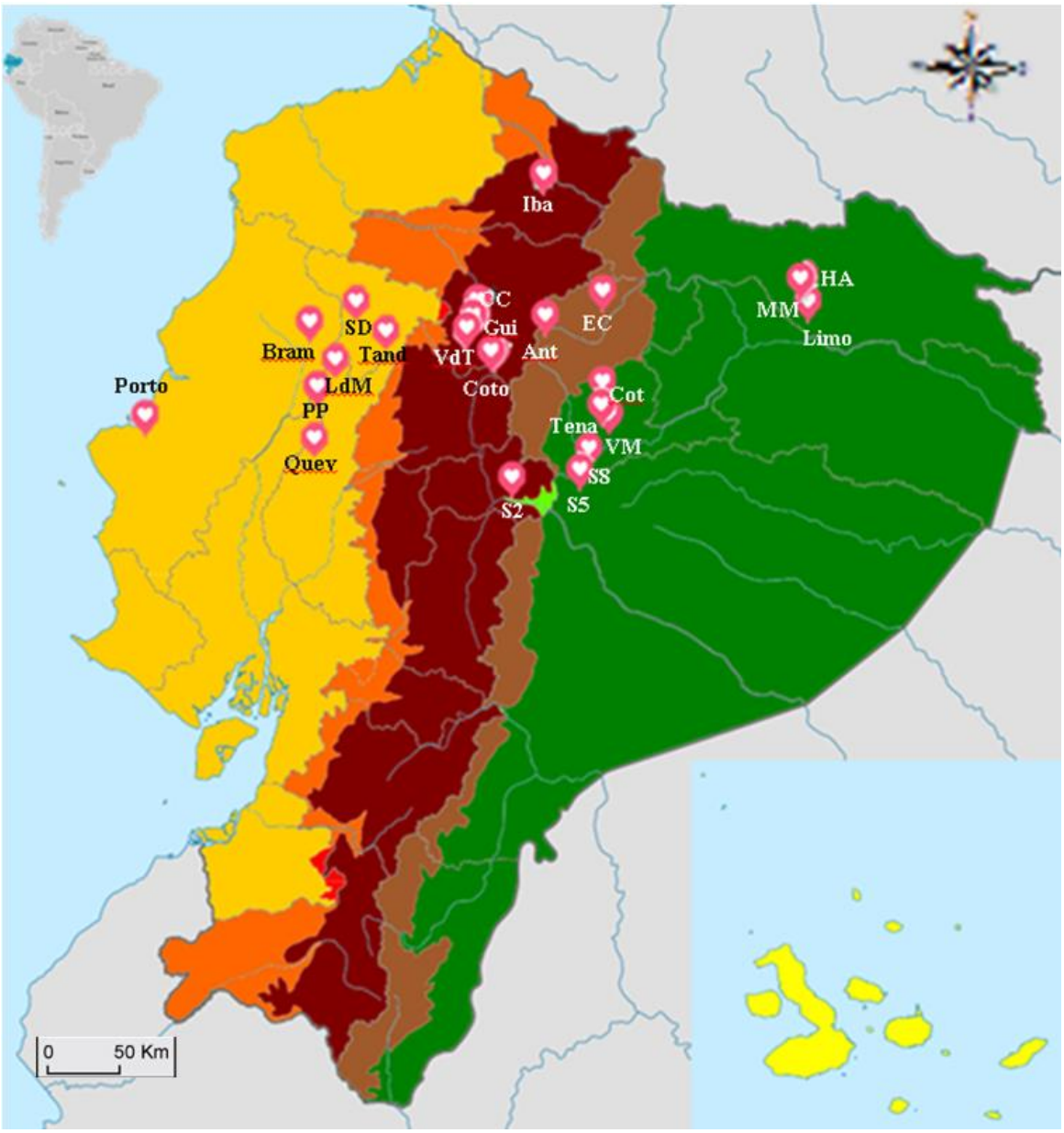

Diagrama 1: Mapa de puntos de muestreo

Elaborado por: autores

Porto: Portoviejo, Quev: Quevedo, PP: Patricia Pilar, LdM: Luz de América, Bram: Bramadora, Tand: Tandapi, SD: Santo Domingo, VdT: Vías del Tren, Cruce de Rieles, Hacienda Santa Beatriz, Hacienda San Agustín, Gui: Güitig 1 y 2, CC: Coca-Cola, Policía 1 y 2, Uyumbicho, Iba: Ibarra 1 y 2, Ant: Antisana, La Mica, Coto: Cotopaxi, Limpiopungo, EC: El Chaco, S2: Agoyán, S5: Teniente Hugo Ortiz, S8: Santa Clara, VM: Vía Misahualli 1, 2, y 3, Tena: Tena Centro y Afueras, Cot: Cotundo, MM: María Massache, Familia Arévalo Bravo, HA: Hacienda Albán, Limo: Limoncocha Frente, Potreros, Puerto, Pishira, Playayacu

ANEXO 3

Diagrama de marcador de peso molecular

100bp Opti-DNA Marker

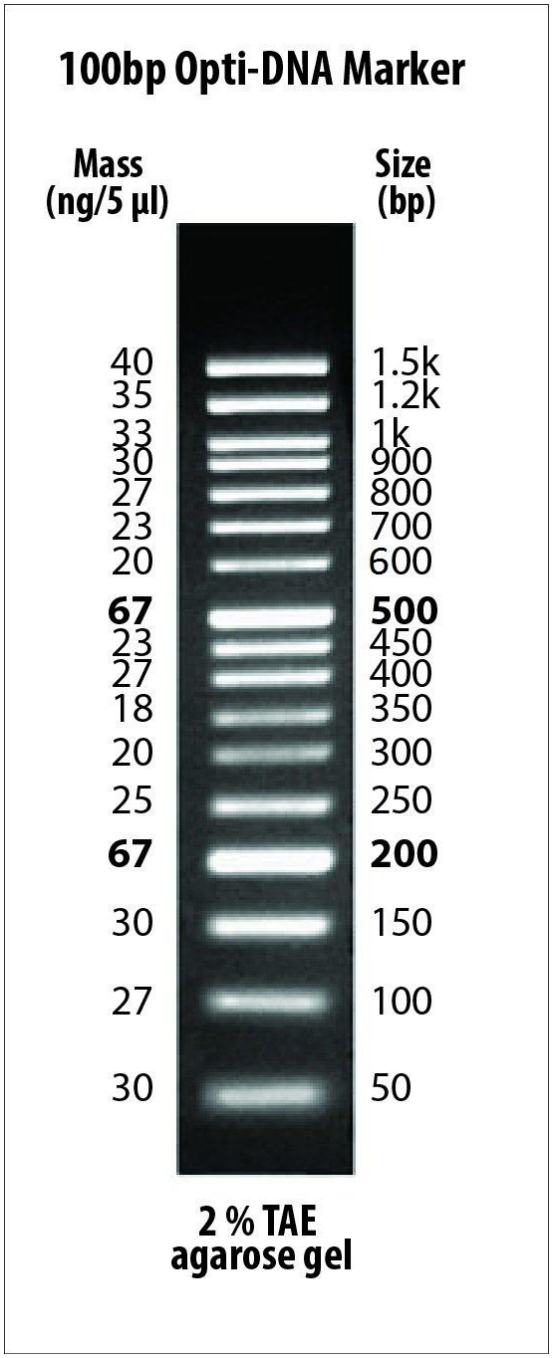

Diagrama 2: 100bp Opti-DNA Marker

ANEXO 4

Geles P1/P2

En los geles presentados a continuación se muestran los resultados obtenidos de la PCR P1/P2 aplicada a todas las colonias aisladas. La presencia de una banda en torno a los 900 pb confirma la pertenencia de las cepas al género *Mycobacterium*

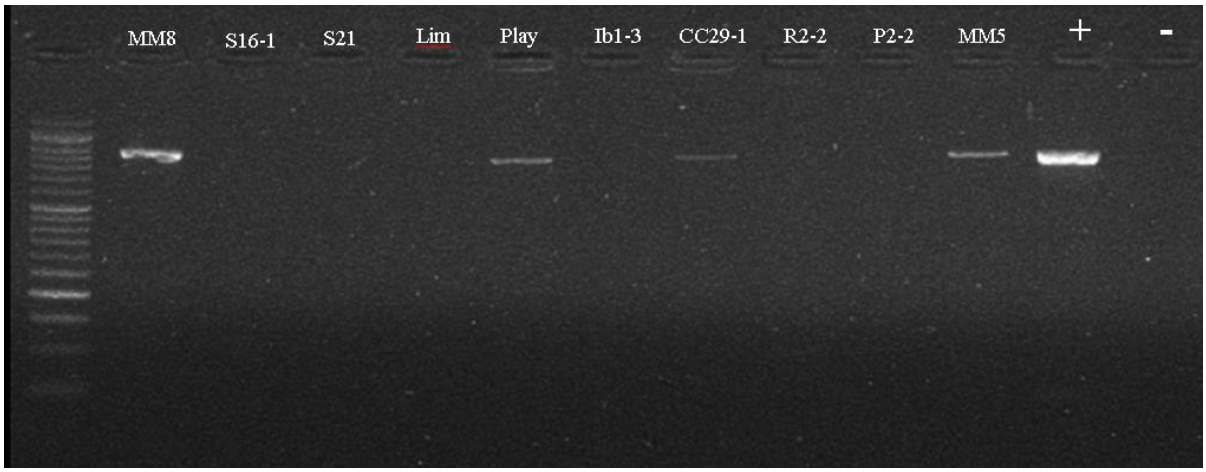

Diagrama 4: P1/P2; 10 primeras muestras

Elaborado por: autores

MM8: María Massache 8, S16-1: Vía Misahualli 3-1, S21: Tena Centro, Lim: Limpiopungo, Play: Playayacu, Ib1-3: Ibarra 1-3, CC29-1: Coca-Cola 29-1, R2-2: Cruce de rieles 2-2, P2-2: Policía 2-2, MM5: María Massache

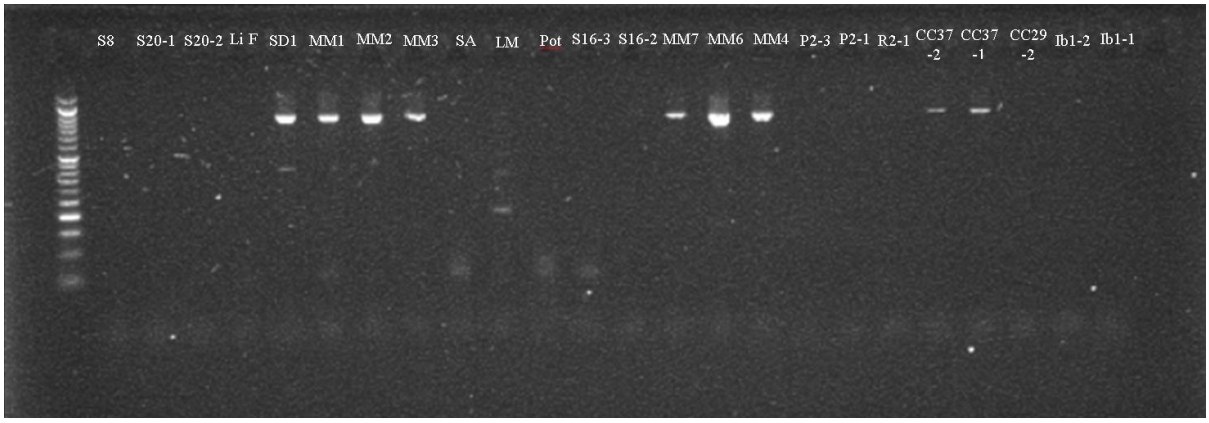

Diagrama 5: P1/P2; Resto de muestras, parte 1

Elaborado por: autores

S8: Santa Clara, S20-1: Tena Afueras-1, S20-2: Tena Afueras-2, Li. F: Limoncocha Frente, SD1: Santo Domingo 1, MM1: María Massache, MM2: María Massache, MM3: María Massache, SA: Hacienda San Agustín, LM: La Mica, Pot: Potreros, S16-3: Vía Misahualli 3-3, S16-2: Vía Misahualli 3-2, MM7: María Massache 7, MM6: María

Massache 6, MM1: María Massache 1, P2-3: Policía 2-3, P2-1: Policía 2-1, R2-1: Cruce de Rieles 2-1, CC37-2: Coca-Cola 37-2, CC37-1: Coca-Cola 37-1, CC29-2: Coca-Cola 29-2, Ib1-2: Ibarra 1-2, Ib1-1: Ibarra 1-1

Diagrama 6: P1/P2; Resto de muestras, parte 2

Elaborado por: autores

G1: Güitig 1, CC37-3: Coca-Cola 37-3, CC29-3: Coca-Cola29-3, Poli 1: Policía 1, HA1: Hacienda Albán 1, Li F 37: Limoncocha Frente 37, VdT 3-1: Vías del tren 3-1, VdT 3-2: Vías del tren 3-2, VdT 3-3: Vías del tren 3-3, VdT 2-1: Vías del tren 2-1, Ib2-3: Ibarra 2-3, Ib 2-2: Ibarra 2-2, Ib 2-1: Ibarra 2-1, HA2: Hacienda Albán 2, HA3: Hacienda Albán 3, S20-3: Tena Afueras 3, HA4: Hacienda Albán 4, SD2: Santo Domingo 2

ANEXO 5

Geles Tb11/Tb12

Las imágenes adjuntas en la parte inferior muestran los resultados obtenidos de la PCR Tb11/Tb12 aplicada a las cepas consideradas como positivas para P1/P2 (que pertenecen al género *Mycobacterium*). La presencia de una banda clara en torno a los 500 pb permite determinar las cepas aptas para la aplicación del PRA.

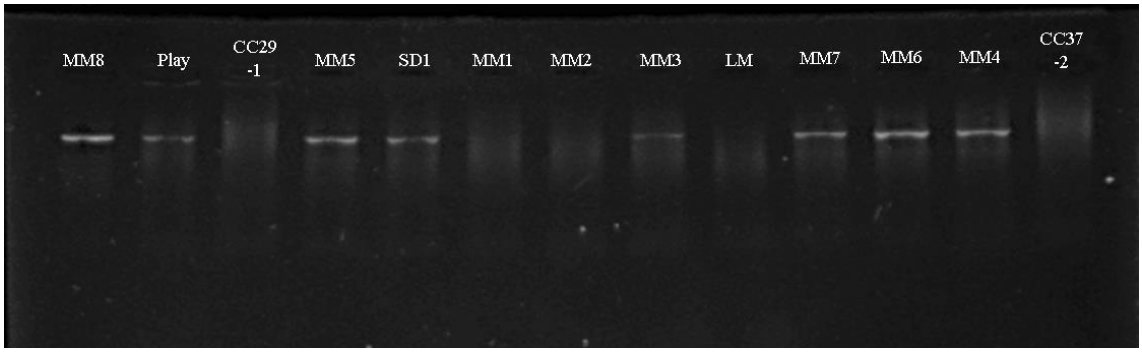

Diagrama 7: Tb11/Tb12; parte 1

Elaborado por: autores

MM8: María Massache 8, Play: Playayacu, CC29-1: Coca-Cola 29-1, MM5: María Massache 5, SD1: Santo Domingo 1, MM1: María Massache 1, MM2: María Massache 2, MM3: María Massache 3, LM: La Mica, MM7: María Massache 7, MM6: María Massache 6, MM4: María Massache 4, CC37-2: Coca-Cola 37-2

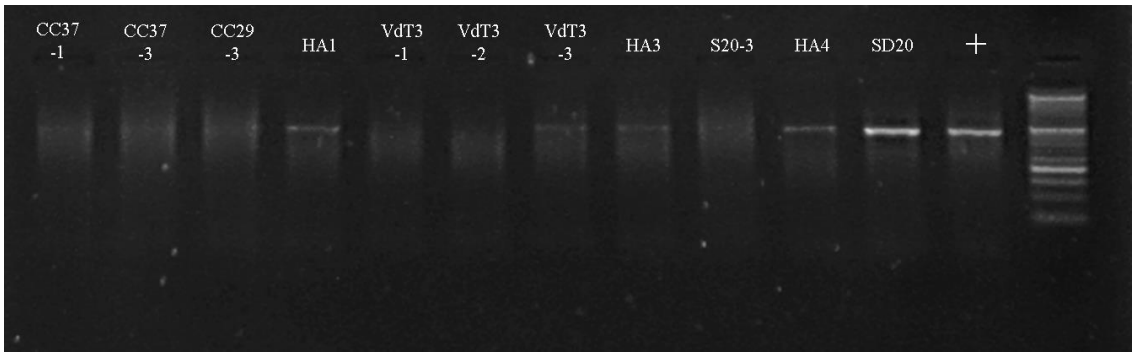

Diagrama 8: Tb11/Tb12; parte 2

Elaborado por: autores

CC37-1: Coca-Cola 37-1, CC37-3: Coca-Cola 37-3, CC29-3: Coca-Cola 29-3, HA1: Hacienda Albán 1, VdT 3-1: Vías del tren 3-1, VdT 3-2: Vías del tren 3-2, VdT 3-3: Vías del tren 3-3, HA3: Hacienda Albán 3, S20-3: Tena Afueras 3, HA4: Hacienda Albán 4, SD20: Santo Domingo 20

ANEXO 6

Geles PRA

Las imágenes adjuntas a continuación muestran los resultados de las digestiones de los amplicones de la PCR Tb11/Tb12 con las enzimas BstEII y HaeIII. Los patrones de bandas sirven como clave taxonómica para la determinación de la especie a la que pertenece la cepa correspondiente.

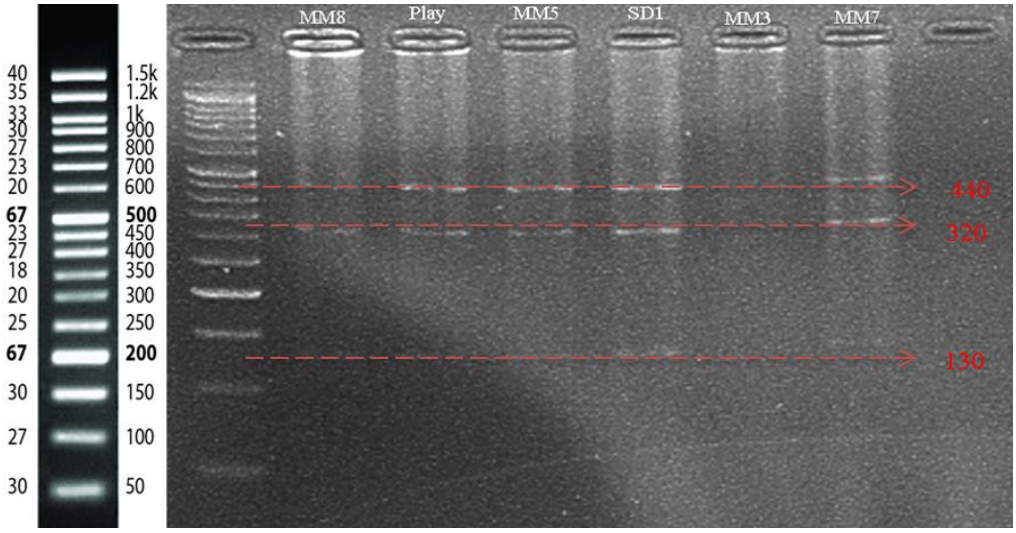

Diagrama 9: BstEII, parte 1

Elaborado por: autores

MM8: María Massache 8, Play: Playayacu, MM5: María Massache 5, SD1: Santo Domingo 1, MM3: María Massache 3, MM7: María Massache 7

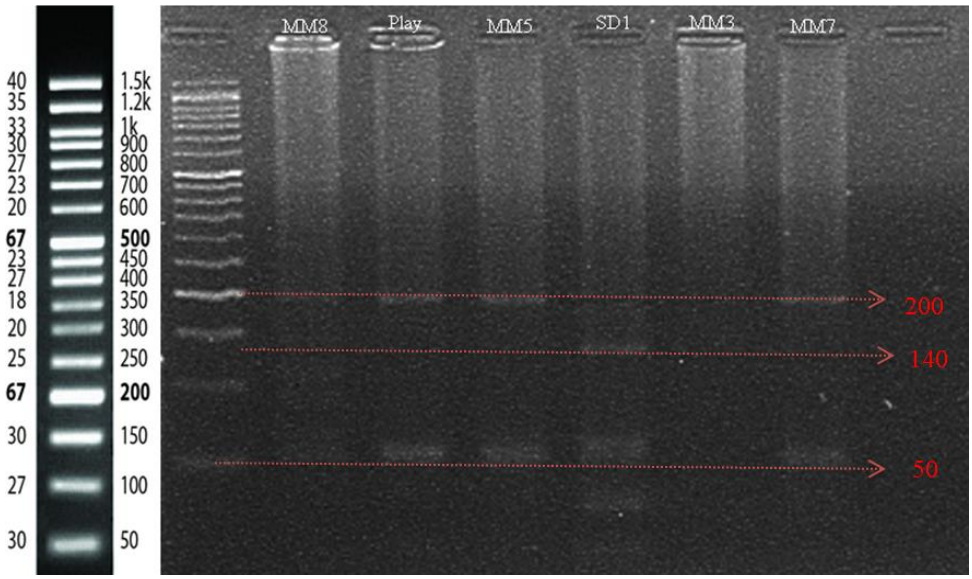

Diagrama 10: BsuRI (HaeIII), parte 1

Elaborado por: autores

MM8: María Massache 8, Play: Playayacu, MM5: María Massache 5, SD1: Santo Domingo 1, MM3: María Massache 3, MM7: María Massache 7

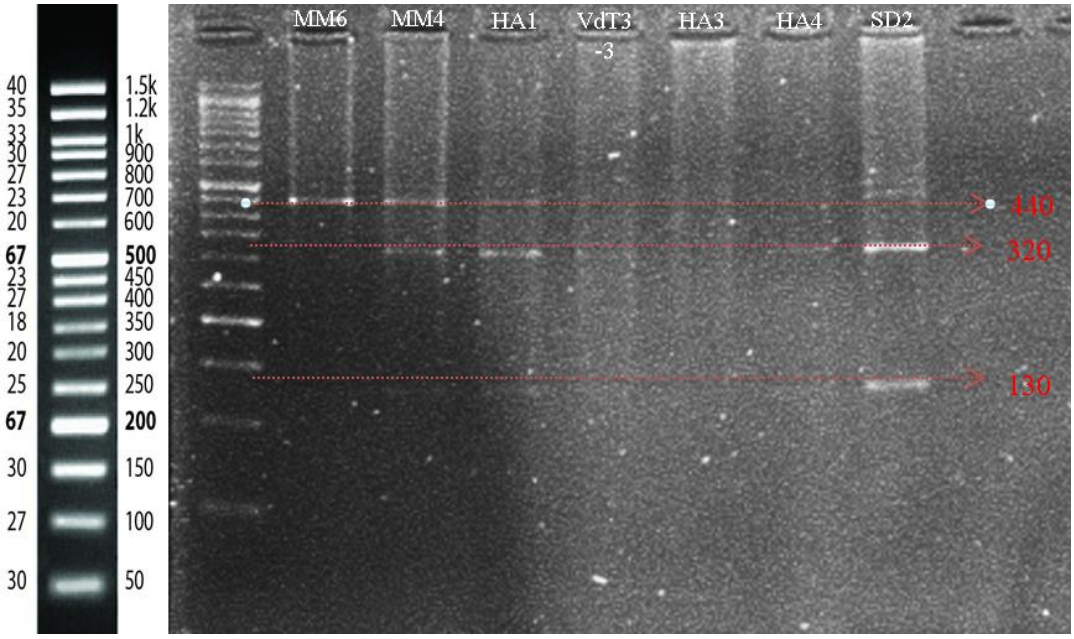

Diagrama 11: BstEII, parte 2

Elaborado por: autores

MM3: María Massache 3, MM4: María Massache 4, HA1: Hacienda Albán 1, VdT 3-3: Vías del tren 3-3, HA3: Hacienda Albán 3, HA4: Hacienda Albán 4, SD2: Santo Domingo 2

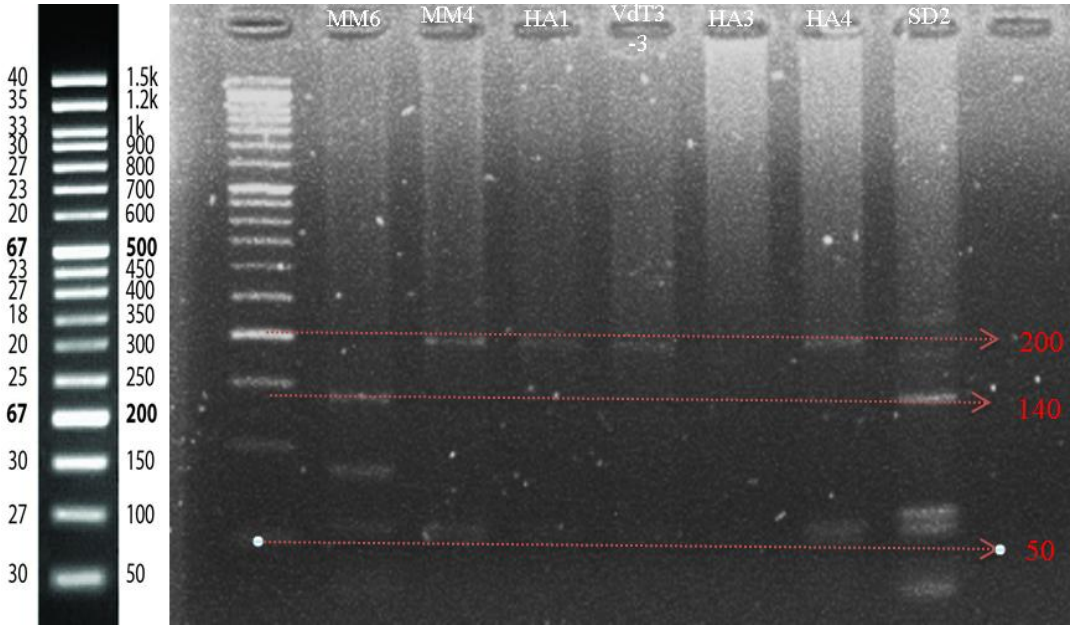

Diagrama 12: BsuRI (HaeIII), parte 2

Elaborado por: autores

MM3: María Massache 3, MM4: María Massache 4, HA1: Hacienda Albán 1, VdT 3-3: Vías del tren 3-3, HA3: Hacienda Albán 3, HA4: Hacienda Albán 4, SD2: Santo Domingo 2