



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

**IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS
PRESENTES EN CULTIVOS DE *OREOCHROMIS NILOTICUS*
(TILAPIA DEL NILO) EN EL CANTÓN TENA, PROVINCIA DE
NAPO**

Proyecto de investigación previo a la obtención del Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: JOHANNA ESTEFANIA GUARANGO VELETANGA

TUTORA: MSc. YEIMY MARLENE ROJAS DE HIDALGO

Napo – Ecuador

2023

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Yo, Johanna Estefanía Guarango Veletanga con documento de identidad N°0106076136, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título Ingeniero en Biotecnología son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Tena, 13 de septiembre de 2023



Johanna Estefanía Guarango Veletanga

0106076136

AUTORIZACION DE PUBLICACION EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, Johanna Estefanía Guarango Veletanga, con documento de identidad N° 0106076136, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS PRESENTES EN CULTIVOS DE *OREOCHROMIS NILOTICUS* (TILAPIA DEL NILO) EN EL CANTÓN TENA, PROVINCIA DE NAPO, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo autorizo a la Universidad Regional Amazónica Ikiam para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Tena, 13 de septiembre de 2023



Johanna Estefanía Guarango Veletanga

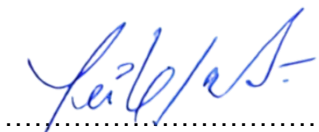
CI: 0106076136

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: "IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS PRESENTES EN CULTIVOS DE *OREOCHROMIS NILOTICUS* (TILAPIA DEL NILO) EN EL CANTÓN TENA, PROVINCIA DE NAPO", en la modalidad de: artículo original, fue realizado por: Johanna Estefanía Guarango Veletanga, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.

Tena, 13 de septiembre de 2023



Yeimy Marlene Rojas de Hidalgo

C.I: 1757847783

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi padre, Pedro, por ser mi fuente de inspiración, motivación, y mi principal fuente de apoyo, y a mi madre, Narciza, por inspirarme a ser mejor y lograr con éxito mi carrera. A los dos, gracias por creer en mí.

A mi tutora, la MSc. Yeimy Rojas por su dedicación y paciencia. Gracias por su orientación y todos sus consejos que serán recordados en mi futuro profesional.

Por último, el más sincero agradecimiento a la Universidad Regional Amazónica Ikiam, por darme la oportunidad de obtener una profesión y ser una ayuda para la sociedad.

DEDICATORIA

Dedicado a mi padre, Pedro.

TABLA DE CONTENIDO

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACION DE PUBLICACION EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	iii
CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR...	iv
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIA	vi
TABLA DE CONTENIDO	vii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE FIGURAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
INTRODUCCIÓN	1
MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
Muestreo de peces.....	3
<i>Estación de muestreo</i>	3
<i>Manejo de muestras</i>	3
Aislamiento y cultivo	3
Extracción de ADN y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	4
Análisis filogenético	5
RESULTADOS	6
DISCUSIÓN	11
CONCLUSIONES	14
REFERENCIAS	15

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Descripción de primers para amplificación y secuenciación del gen *16S*

rRNA de las bacterias positivas a la tinción de ZN 5

Tabla 2: Detalles de las colonias positivas a tinción de ZN aisladas en órganos de *O.*

niloticus..... 8

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1: Características microscópicas y morfológicas de colonias micobacterianas.	6
Figura 2: Árbol filogenético basado en las secuencias del gen <i>16S rRNA</i> construido con el método Maximun Likelihood (ML).....	9
Figura 3: Mapa de los puntos de muestreo de <i>O. niloticus</i> junto con el número de especies de MNT identificadas.....	10

RESUMEN

Las micobacterias no tuberculosas desencadenan infecciones graves en peces que afectan la producción en la acuicultura y piscicultura. En este estudio, se investigó la presencia de *Mycobacterium* spp. en *Oreochromis niloticus* (tilapia del Nilo), especie ampliamente cultivada y comercializada en Napo. Se estudiaron un total de 206 muestras de peces que fueron adquiridas de ocho diferentes estanques piscícolas ubicados dentro del cantón Tena. No se observaron signos clínicos de micobacteriosis, sin embargo, mediante tinción de Ziehl-Neelsen se obtuvieron 27 cultivos positivos que reflejaban la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes. Mediante amplificación y secuenciación del gen de mantenimiento 16S *rRNA*, ocho micobacterias fueron identificadas como estrechamente relacionadas a *Mycolicibacterium septicum*, cinco relacionadas a *Mycobacterium paragordoniae*/*Mycobacterium gordonae*, tres a *Mycolicibacterium septicum*/*Mycolicibacterium porcinum*, dos relacionadas a *Mycobacterium seoulense*; mientras que *Mycolicibacterium llutzerense*, *Mycobacteroides immunogenum*, *Mycolicibacterium senegalense*/*Mycolicibacterium farcinogenes*, *Mycolicibacterium vaccae*/*Mycolicibacterium vanbaalenii*, *Mycolicibacterium insubricum*, y *Mycolicibacterium fortuitum*, produjeron un solo aislado cada uno. El análisis filogenético confirmó los resultados de la secuenciación de genes, no obstante, no pudo diferenciar la identificación de algunas especies debido a la alta homología de las mismas. Este estudio representa el primer reporte de *Mycobacterium* en granjas de cultivo de tilapias del Nilo de la Amazonía ecuatoriana.

Palabras clave: *Mycobacterium* spp., micobacteriosis, zoonosis, acuicultura, piscicultura.

ABSTRACT

Non-tuberculous mycobacteria trigger severe infections in fish, negatively impacting production in aquaculture and fish farming. In this study, the presence of *Mycobacterium* spp. in *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia), a widely cultivated and commercially traded species in Napo, was investigated. A total of 206 fish samples were collected from eight different fishponds located within the Tena canton. No clinical signs of mycobacteriosis were observed; however, 27 positive cultures reflecting the presence of acid-alcohol-resistant bacilli were obtained through Ziehl-Neelsen staining. Through amplification and sequencing of the 16S rRNA housekeeping gene, eight mycobacteria were identified as closely related to *Mycolicibacterium septicum*, five related to *Mycobacterium paragordoniae*/*Mycobacterium gordonae*, three to *Mycolicibacterium septicum*/*Mycolicibacterium porcinum*, two related to *Mycobacterium seoulense*, while *Mycolicibacterium llatzerense*, *Mycobacteroides immunogenum*, *Mycolicibacterium senegalense*/*Mycolicibacterium farcinogenes*, *Mycolicibacterium vaccae*/*Mycolicibacterium vanbaalenii*, *Mycolicibacterium insubricum*, and *Mycolicibacterium fortuitum* yielded a single isolate each. Phylogenetic analysis confirmed the gene sequencing results; however, it could not differentiate the identification of some species due to their high homology. This study represents the first report of *Mycobacterium* in Nile tilapia farms in the Ecuadorian Amazon.

Keywords: *Mycobacterium* spp., mycobacteriosis, zoonosis, aquaculture, fish farming.

INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una actividad que genera importantes fuentes de alimento para millones de personas en el mundo [1]. El aumento de la población y del consumo per cápita, impulsa al crecimiento de esta actividad, con una producción pesquera estimada de 202 millones de toneladas para el año 2030 [2]. No obstante, la sustentabilidad del sector acuícola se ve afectada por enfermedades infecciosas causadas principalmente por bacterias, virus, parásitos y hongos [3]. En particular, las infecciones bacterianas son capaces de destruir cultivos enteros y generar pérdidas económicas significativas cuando no se aplican tratamientos curativos o preventivos [2,4]. Dentro de este panorama, la micobacteriosis, una infección causada por micobacterias no tuberculosas (MNT), se presenta como un desafío relevante en la acuicultura debido a la falta actual de vacunas o antibioticoterapias apropiadas para el tratamiento y control de esta enfermedad [5].

La micobacteriosis afecta a más de 200 especies de peces y puede ser adquirida a través de la ingestión de alimentos contaminados, el canibalismo de peces enfermos, la inoculación a través de lesiones y el consumo de desechos ambientales [6,7]. Cuando la infección se activa se visualizan signos clínicos como pérdida de escamas, ulceración dérmica, cambios pigmentarios, comportamiento anormal, emaciación y ascitis [8]. Internamente puede producir nódulos de color blanco que se desarrollan comúnmente en los riñones, corazón, hígado y bazo [9]. Debido a la gravedad de estos síntomas la mortalidad puede alcanzar el 100% [5]. No obstante, la micobacteriosis puede tardar varios años en manifestarse y pasar de un estado asintomático a la enfermedad clínica, en lo cual, las condiciones ambientales y el estrés son factores importantes en el desarrollo de la infección [7,10].

Las MNT se caracterizan por ser bacilos ubicuos ácido-alcohol resistentes y se clasifican en micobacterias de lento crecimiento (MLC) y micobacterias de rápido crecimiento (MRC) [11]. Las especies más reportadas en infecciones en peces son *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae* y *Mycobacterium gordonae*, las cuales, también han demostrado ser potencialmente riesgosas en humanos debido a su naturaleza zoonótica [12]. Estas MNT generan problemas a la salud pública, particularmente en personas con inmunosupresión grave que mantienen contacto con el agua o animales acuáticos

contaminados [13]. Entre los síntomas que pueden llegar a producir en humanos encontramos lesiones cutáneas nodulares, principalmente en las manos, que pueden progresar a tenosinovitis, artritis y osteomielitis si no se aplica un diagnóstico y tratamiento adecuado [14].

Los reportes de infecciones micobacterianas han incrementado en la producción controlada de especies como el esturión, lenguado, gobio barbero, salmón y la tilapia del Nilo [15–19]. Dentro de este grupo, *Oreochromis niloticus*, comúnmente conocida como tilapia del Nilo, destaca como el tercer cultivo principal en la acuicultura a nivel mundial, con una producción registrada de 4,407.2 toneladas en el año 2020 [2]. Para la Amazonía ecuatoriana, la piscicultura de *O. niloticus* representa una de las principales actividades que provee de alimentación y sustento económico a las poblaciones nativas [20]. No obstante, en Ecuador no se ha reportado datos relevantes sobre las especies de MNT que circulan en la industria acuícola del país.

Dada la importancia económica y los posibles problemas de salud pública de la micobacteriosis en cultivos de peces de interés comercial, los reportes sobre las especies causantes de micobacteriosis de la tilapia del Nilo son de gran importancia a nivel nacional. El presente estudio, identifica MNT en *O. niloticus* criadas por piscicultura en la provincia de Napo, cantón Tena. La identificación se realiza utilizando técnicas de cultivo selectivos de micobacterias, tinción de Ziehl-Neelsen, amplificación del gen 16S rRNA y posterior análisis de secuencias. Adicionalmente, se hace un análisis filogenético para relacionar la distribución de las especies encontradas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo de peces

Estación de muestreo

Las tilapias del Nilo fueron compradas entre septiembre de 2022 y abril de 2023 de ocho diferentes granjas de cultivo ubicadas en las parroquias Tena, Muyuna, Pano, y Puerto Napo del cantón Tena. Los peces fueron colectados por un muestreo de conveniencia, llegando a un tamaño de muestra total de 103 tilapias.

Manejo de muestras

Las tilapias, de un peso aproximado de 400 g, fueron capturadas por los piscicultores con una red de mano. Después de su compra, los peces fueron colocados individualmente en bolsas herméticas de polipropileno y transportados en una hielera hasta el laboratorio de Biología Molecular Docencia de la Universidad Regional Amazónica Ikiam para ser procesados dentro de las 3 h posteriores a la recolección. Durante este trayecto los peces murieron por hipoxia. Cada individuo, se examinó externamente buscando la posible presencia de lesiones atribuibles a micobacteriosis, seguidamente se sometieron a disección aséptica aplicando las técnicas previamente descritas por Yanong [21]. De cada individuo, se tomaron aproximadamente 0.1 g de muestras de órganos internos (hígado, bazo y riñón) y se colocaron en un tubo de 1.5 ml con 800 µl de solución salina fisiológica estéril (SSFe). En un tubo aparte, se procesaron aproximadamente 0.1 g de las branquias en 800 µl de SSFe y en cada caso se maceraron las muestras con micropistilos hasta homogeneizarlas.

Aislamiento y cultivo

Las muestras homogenizadas fueron tratadas con dos métodos con la finalidad de disminuir la contaminación por bacterias de rápido crecimiento que compiten por los nutrientes del medio. El primer método se basó en el protocolo de Ambrosio et al. [22], alícuotas de 400 µl de los homogenizados se trataron agregando el mismo volumen de cloruro de hexadecilpiridinio (HPC) al 0.1% por 20 min y luego se centrifugaron a 1.900 g por 15 min, se descartó el sobrenadante y se neutralizó realizando tres lavados con

800 µl de agua destilada estéril. Posterior al último lavado se aplicó una reforma del método de Petroff modificado por Brian y Baker [23], los pellets se resuspendieron con 90 µl de agua destilada estéril y se añadió el mismo volumen de NaOH al 4% por 2 min, se centrifugó a 1.900 g por 5 min, se descartó el sobrenadante y se neutralizó con dos lavados con 90 µl de agua destilada estéril. Siguiendo el protocolo de Rhodes et al. [24], los pellets se resuspendieron en 0.1 ml de agua destilada estéril, se homogenizó y se inocularon los 0.1 ml en tubos de cultivo con medio Lowenstein-Jensen (LJ). Los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante tres meses y fueron revisados diariamente para detectar el crecimiento bacteriano. Se realizó tinción Ziehl-Neelsen (ZN) a las colonias de cultivos axénicos para determinar la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR). Finalmente, para los análisis moleculares se extrajo el ADN. Adicionalmente, las colonias se criopreservaron para generar un banco de cepas de micobacterias.

Extracción de ADN y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El método rápido modificado de los protocolos desarrollados por Koentjoro et al. [25] y Ledesma et al. [26] fue utilizado para la extracción de ADN de las colonias que dieron positivo a la tinción de ZN. Resumiendo brevemente el método, dos colonias fenotípicamente iguales fueron suspendidas en 0.5 ml de Buffer TE 1X. Seguido, estas se mezclaron con vórtex e incubaron en un termobloque a 100 ° C durante 8 min. Luego, la suspensión se centrifugó a 17.000 g durante 5 min y se transfirió 300 µL del sobrenadante a un tubo estéril. El ADN obtenido en el sobrenadante se conservó a 4°C hasta el momento de la amplificación por PCR.

La PCR se llevó a cabo en un termociclador ProFlex™ PCR System (Applied Biosystems™ 4484073), usando GoTaq® Flexi DNA Polymerase de Promega®. Las secuencias de los primers usados en la reacción se describen en el Cuadro 1. Las mezclas y condiciones de PCR se han descrito previamente por Hernandez et al. [27], con la diferencia que en este trabajo se emplearon 5 µL de ADN molde en lugar de 1 µL. Los amplicones se visualizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% usando el tinte SYBR Safe® DNA gel stain de Invitrogen y posteriormente fueron enviados al Departamento de Servicios de la Universidad de las Américas (Quito, Ecuador) para la secuenciación. Los productos se secuenciaron con el método de Sanger y se examinaron con el analizador genético ABI 3500xL de Applied Biosystems.

Tabla 1: Descripción de primers para amplificación y secuenciación del gen *16S rRNA* de las bacterias positivas a la tinción de ZN

Gen	Primer	Secuencia	Nucleótidos	Temperatura de annealing	Referencia
16S	A1F (<i>Forward</i>)	5'- CTGGCTCAGGACGAACGCTG- 3'	20-39	63 °C	[28]
	54R (<i>Reverse</i>)	5'- TCTAGTCTGCCCCGTATCGCCC- 3'	654-634		

Realizado por: Johanna Guarango

Las secuencias *forward* y *reverse* obtenidas del gen *16S rRNA* se ensamblaron y las secuencias consenso se editaron utilizando la plataforma de Análisis de Genética Evolutiva Molecular (MEGA) versión 11 [29]. Para la identificación de especies se utilizó Megablast con la base de datos Nucleotide collection (nt) de la plataforma del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) [30].

Análisis filogenético

Como análisis adicional para la determinación de especies se construyó un árbol filogenético utilizando los datos obtenidos mediante la secuenciación del fragmento del gen *16S rRNA*. Las secuencias consenso fueron alineadas con 29 secuencias de referencia de *Mycobacterium* recuperadas de GenBank [31]. La alineación de la matriz de datos se realizó con la herramienta MUSCLE [32]. Para la construcción del árbol se utilizó el método Maximun Likelihood (ML) y el modelo evolutivo fue seleccionado mediante la herramienta Models del programa MEGA 11. La precisión resultante se midió mediante un bootstrap de 1000 repeticiones.

RESULTADOS

De los 103 peces procesados, ninguno presentó signos de micobacteriosis, sin embargo, en cuatro de ellos se observó palidez en hígado y branquias. Un total de 206 muestras fueron procesadas y se detectó crecimiento de colonias en aquellas provenientes de siete de las ocho granjas de cultivo evaluadas. En total, 29 aislados dieron positivo para tinción de ZN. De estos, 27 se visualizaron como bacilos delgados ligeramente curvados (Figura 1a) y las colonias presentaron las características típicas del género *Mycobacterium*, crecimiento lento, producción de pigmento en unas y rugosidad en otras (Figura 1b). Las dos colonias restantes presentaron morfología cocoide y en medio LJ exhibían un color naranja pálido.

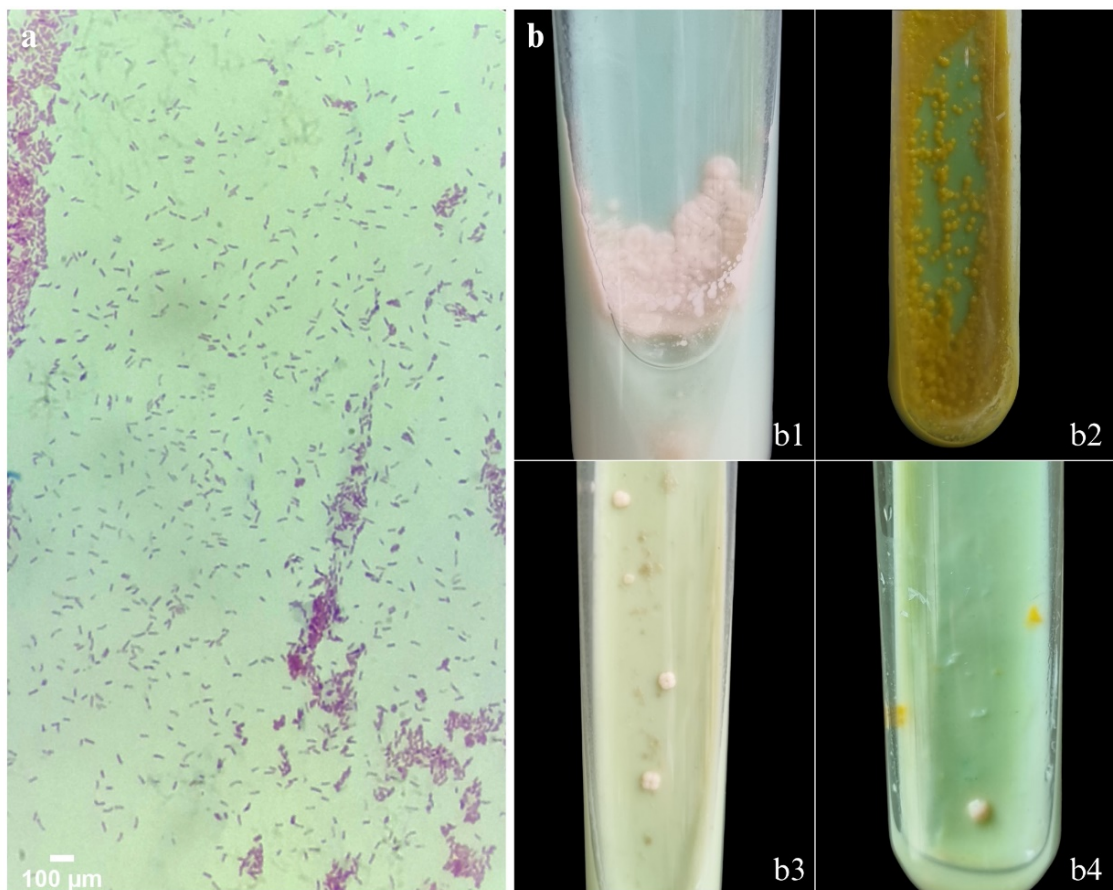


Figura 1: Características microscópicas y morfológicas de colonias micobacterianas.

Realizado por: Johanna Guarango

a) Fotomicrografía de una colonia micobacteriana (aumento de 100x). b) Diversidad de colonias crecidas en medio LJ: b1) Colonia MY-12 (*M. septicum*); b2) colonia MY-14 (*M. paragordoniae*/*M. gordonae*); b3) colonia SR-18 (*M. septicum*); b4) colonia blanca MY2-57 (*M. septicum*) y colonia amarilla MY2x-57 (*M. paragordoniae*/*M. gordonae*).

Los detalles fenotípicos de los aislamientos de micobacterias recolectadas en este estudio se presentan en la Tabla 2. De los 29 aislados totales, 26 se secuenciaron correctamente para el gen *16S rRNA* mientras que los 3 aislados restantes presentaron cromatogramas con alto ruido. Las dos cepas con forma cocoide se identificaron como *Rhodococcus* sp. Las colonias SR-18, SR-21, SR-23, GC-44, GC-47 y GC-49 se clasificaron como MRC y las demás se clasificaron como MLC. Dentro del grupo de lento crecimiento, siete colonias (LG-6, MY-14, SR-19, SR-24, MY2x-57, MY2-63 y TA-95b) se clasificaron como escotocromógenas, debido a que desarrollaron un color amarillo anaranjado en la incubación oscura.

Los porcentajes de identidad obtenidos en BLAST se presentan en el Cuadro 2. Las colonias LG-69, MY-14, SR-19, SR-24, SR2p-32, SR2-34, GC-47, MY2x-57, MY2x-58 y TA-95b presentaron porcentajes de identidad altos (98.5-100%) con dos especies diferentes. El árbol filogenético del gen *16S rRNA* (Figura 2) involucró 54 secuencias de nucleótidos: 24 secuencias de MNT obtenidas del estudio, 29 secuencias de *Mycobacterium* spp. descargadas de GenBank y 1 secuencia de *Nocardia aobensis* que fue usada para enraizar. El modelo evolutivo usado para esta estimación fue el T92+G. Los valores del soporte nodal son mostrados en las ramas como el porcentaje de árboles (Frecuencia) en los que los taxones asociados se agruparon. El árbol está dibujado a escala, con las longitudes de las ramas medidas en número de sustituciones por sitio.

Tabla 2: Detalles de las colonias positivas a tinción de ZN aisladas en órganos de *O. niloticus*

Fecha de muestreo	Granja* n = peces totales recolectados	ID pez [‡]	Código colonia	Días de crecimiento	Especie identificada	% Identidad BLAST
19/09/2022	G1 n = 22	6A	LG-6 ^ψ	63	<i>M. seoulense</i>	99.79
09/02/2023		69A	LG-69	17	<i>M. paragordoniae/M. gordonae</i>	100
04/10/2022	G2 n = 10	12A	MY-12	14	<i>M. septicum</i>	100
		14A	MY-14 ^ψ	36	<i>M. paragordoniae/M. gordonae</i>	100
17/10/2022	G3 n = 10	18A	SR-18	7	<i>M. septicum</i>	100
		19A	SR-19 ^ψ	35	<i>M. paragordoniae/M. gordonae</i>	100
		21A	SR-21	7	<i>M. septicum</i>	100
		23A	SR-23	7	<i>M. septicum</i>	100
		24A	SR-24 ^ψ	40	<i>M. paragordoniae/M. gordonae</i>	100
		27A	SR-27	35	-----	Secuencia no legible
08/11/2022	G4 n = 16	30A	SR2-30	13	<i>M. septicum</i>	99.78
		32A	SR2p-32	21	<i>M. septicum/M. porcinum</i>	100
		34A	SR2-34	13	<i>M. septicum/M. porcinum</i>	100
29/11/2022	G5 n = 10	44A	GC-44	7	<i>M. llatzerense</i>	100
		44B	GC-44b	42	<i>Rhodococcus sp.</i>	100
		46B	GC-46b	42	<i>Rhodococcus sp.</i>	100
		47A	GC-47	7	<i>M. septicum/M. porcinum</i>	99.78
		49A	GC-49	7	<i>M. immunogenum</i>	100
10/10/2022	G6 n = 10	57A	MY2-57	30	<i>M. septicum</i>	99.78
			MY2x-57 ^ψ	30	<i>M. paragordoniae/M. gordonae</i>	99.79
		58A	MY2-58	14	<i>M. septicum</i>	100
			MY2x-58	14	<i>M. senegalense/M. farcinogenes</i>	99.79
		62A	MY2-62	20	<i>M. septicum</i>	100
		63A	MY2-63 ^ψ	42	<i>M. seoulense</i>	99.80
23/03/2023	G7 n = 10	95B	TA-95b ^ψ	14	<i>M. vaccae/M. vanbaalenii</i>	98.50
		97A	TA-97	6	-----	Secuencia no legible
		98A	TA-98	14	-----	Secuencia no legible
		102A	TA-102	14	<i>M. insubricum</i>	100
		103A	TA-103	22	<i>M. fortuitum</i>	100
05/04/2023	G8 n = 15	-----	-----	-----	-----	-----

Realizado por: Johanna Guarango.

*Granja G1, Comunidad de Lagarto Cocha (LG); granjas G2 y G6, ubicadas en Muyuna (MY) y granjas G3 y G4, ubicadas en la Comunidad Las Palmas-Sapo Rumi (SR). Granja G5, Comunidad Guinea Chimbana (GC); granja G7, ubicada en Tena (TA) y granja G8 ubicada en Puerto Napo (PN). Las ubicaciones geográficas se presentan en la Figura 3.

[‡] Las ID con letra A, refieren al uso de las branquias para el aislamiento; las ID con letra B, refieren al uso de los homogenizados de hígado, bazo y riñón para el aislamiento.

^ψ Colonias escotocromógenas.



Figura 2: Árbol filogenético basado en las secuencias del gen 16S rRNA construido con el método Maximun Likelihood (ML).

Realizado por: Johanna Guarango

En el árbol se muestran las relaciones entre los aislamientos y otras especies de *Mycobacterium* descargadas de GenBank, los códigos de acceso se muestran entre paréntesis. Bootstrap se replicó 1000 veces.

Los especímenes de rápido crecimiento *M. vanbaalenii* y *M. vaccae*, fueron agrupados con la cepa TA-95b en un clado (color celeste Figura 2) con una frecuencia alta de 99%. Todas las MLC y *M. insubricum* fueron agrupadas en un clado con una frecuencia baja de 37%. Dentro de este gran clado se observan dos grupos mayores: el grupo de color café que asocia la colonia TA-102 con *M. insubricum* con un soporte de 100% y el grupo de color rosado donde LG-6 y MY2-63 forman un grupo con *M. seoulense* (Frecuencia=91%), mientras que las colonias MY-14, SR-19, SR-24, M2x-57, LG-69 formaron un grupo con *M. paragordoniae* y *M. gordonae* con un soporte nodal de 100%. Gran parte de las MRC obtenidas de GenBank junto con 15 colonias aisladas en el cantón Tena fueron agrupadas en un clado (color verde) medianamente sustentado (Frecuencia=57%).

En total, ocho micobacterias fueron relacionadas estrechamente con *M. septicum*, cinco con *M. paragordoniae*/*M. gordonae*, tres con *M. septicum*/*M. porcinum*, dos con *M. seoulense*; y *M. llatzerense*, *M. immunogenum*, *M. senegalense*/*M. farcinogenes*, *M. vaccae*/*M. vanbaalenii*, *M. insubricum*, *M. fortuitum*, se los relacionó a un solo aislado de cada uno.

Las ubicaciones de las granjas de cultivo muestreadas junto con las especies aisladas se presentan en la Figura 3. *M. septicum* fue la especie que se identificó en más sitios (cinco de ocho localidades), seguido de *M. paragordoniae*/*M. gordonae* que se aislaron en cuatro sitios, y *M. seoulense* en dos.

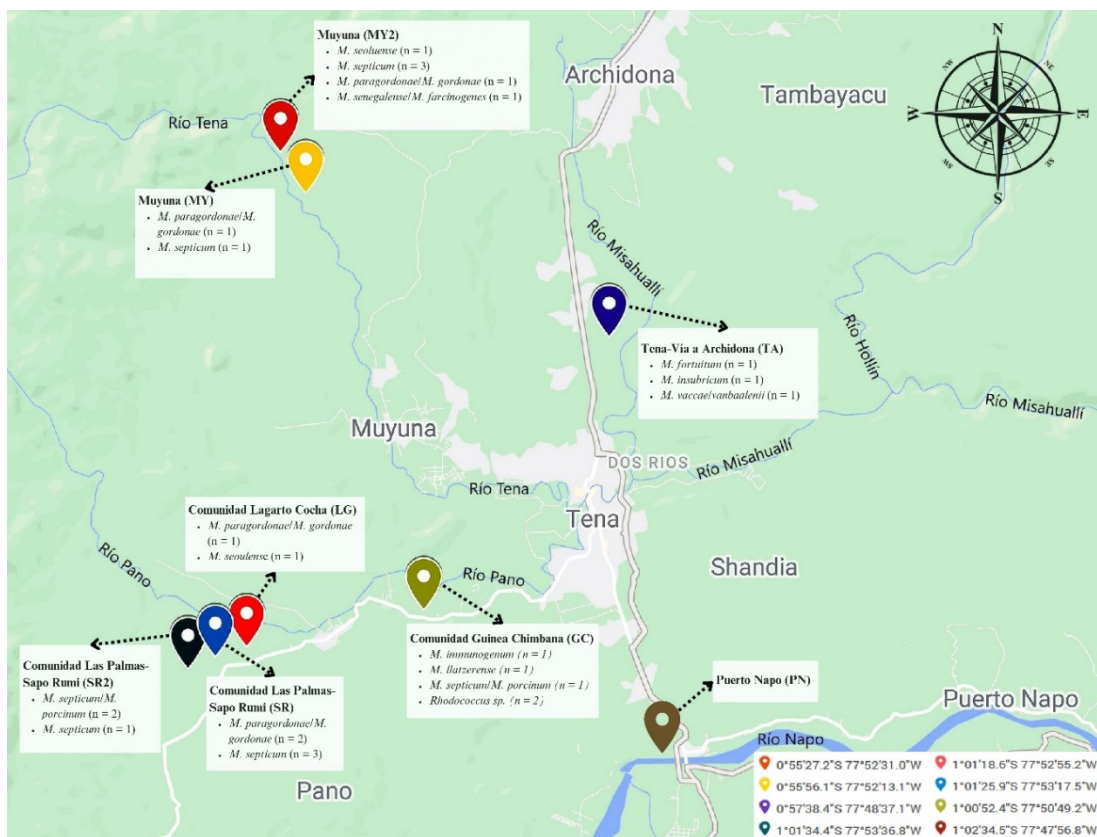


Figura 3: Mapa de los puntos de muestreo de *O. niloticus* junto con el número de especies de MNT identificadas.

Realizado por: Johanna Guarango

En la parte inferior izquierda de la figura se detallan las coordenadas de las diferentes localidades.

DISCUSIÓN

Las infecciones micobacterianas se han reportado en una amplia variedad de peces de agua dulce y salada [6]. En este estudio no se visualizó ningún síntoma característico de micobacteriosis, sin embargo, un total de 27 cultivos selectivos de micobacterias fueron recuperados a partir de órganos de *O. niloticus* de cultivos localizados en el cantón Tena. Se identificaron seis especies estrechamente relacionadas con *M. seoulense*, *M. septicum*, *M. llatzerense*, *M. immunogenum*, *M. insubricum*, y *M. fortuitum*, y ocho especies con homología identificadas como *M. paragordoniae/M. gordonae*, *M. septicum/M. porcinum*, *M. senegalense/M. farcinogenes*, *M. vaccae/M. vanbaalenii*. No obstante, es importante resaltar que del 100% de aislados micobacterianos (n=27), el 96.30% (n=26) fueron recuperados a partir de las branquias y no de los homogenizados de hígado, bazo y riñón. La piel y las branquias están en constante contacto con el agua del cultivo y sus microorganismos por lo tanto, la carga microbiana en estos tejidos es alta [33]. Por esta razón, para un diagnóstico adecuado de micobacteriosis en peces, debe evitarse el aislamiento a partir de homogenizados que incluyan piel, branquias o el pescado entero. Las micobacterias aisladas en cultivos de especies comerciales por Sevim et al. [34], y Gcebe et al. [35], podrían haber estado presentes de manera pasiva en los tejidos donde fueron recuperadas. Sin embargo, este tipo de estudios ayudan a pronosticar el desarrollo de micobacteriosis y, de esta manera, evitar la generación de pérdidas económicas en la piscicultura por la destrucción total de los cultivos afectados. Se ha informado casos de éxito en el tratamiento de infecciones causadas por especies del género *Mycobacterium* en peces ornamentales utilizando antibióticos [36], no obstante, el uso de estos fármacos en peces comerciales está estrictamente regulado en diversos países debido al desarrollo y transferencia de mecanismos de resistencia entre especies bacterianas, algunas de las cuales también son patógenos para los seres humanos [37]. Por lo tanto, hasta el momento, la profilaxis sigue siendo la mejor opción para el control de la micobacteriosis.

La detección de *Rhodococcus* sp. en los órganos de las tilapias concuerda con investigaciones anteriores que han establecido al género *Rhodococcus* como parte de la microbiota intestinal benéfica de peces, así como su potencial uso como probiótico en la acuicultura [38].

Las especies *M. paragordoniae* y *M. gordonae* han sido reportadas en brotes de micobacteriosis en cultivos de carpas koi, en esturiones y en peces guppy, en donde se visualizaron granulomas característicos de la infección [15,39,40]. *M. fortuitum* es la especie mayormente relacionada con infecciones micobacterianas, se ha detectado en peces ornamentales [41], en granjas de cultivo de lisa blanca [42], así como, en granjas de cultivo de tilapia del Nilo en México, en donde *M. fortuitum* se la asoció como una de las principales especies en producir mortalidad [19]. Un total de cinco aislados de *M. paragordoniae*/*M. gordonae* fueron recuperados de cuatro de las siete diferentes localidades muestreadas, y, pese a que no se llegó a visualizar ninguna anomalía, no se debe descartar la presencia de la infección, pues, se conoce que la micobacteriosis puede no producir signos clínicos [8]. De igual manera, aunque se obtuvo un solo aislado, *M. fortuitum* representa un riesgo económico para los piscicultores de la zona por los reportes previamente mencionados de la alta mortalidad asociada a la formación de granulomas en órganos internos durante una infección crónica [43,44]. Se debe tener presente que las condiciones ambientales y el estrés ocasionado por la mala calidad del agua o la alta densidad de cultivo (comunes en la piscicultura) son factores importantes en la activación de la enfermedad [5]. En la literatura, no se ha encontrado reportes de micobacteriosis en peces por *M. septicum*, *M. llatzerense*, *M. seoulense*, *M. immunogenum*, *M. porcinum*, *M. senegalense*/*M. farcinogenes*, *M. insubricum*, *M. vaccae*/*M. vanbaalenii*.

Las MNT identificadas en los cultivos de *O. niloticus*, también representan un riesgo para la salud pública por el potencial zoonótico de algunas especies. Las infecciones pueden producirse por la exposición de una herida abierta a fuentes de agua contaminada o por lesiones causadas por aletas de pescados contaminados [13]. Se conoce que *M. gordonae*, *M. porcinum*, *M. senegalense*/*M. farcinogenes* y *M. fortuitum* pueden causar lesiones cutáneas dolorosas como nódulos violáceos, abscesos, celulitis o foliculitis con diferentes grados de riesgo, en personas inmunocompetentes e inmunodeprimidas [45–49], mientras que *M. llatzerense* solo se ha reportado en pacientes inmunocomprometidos [50]. Por esta razón, la manipulación de los peces en los cultivos y el pescado crudo, debe realizarse usando medidas de protección. *M. insubricum* ha sido aislado de muestras de esputo, no obstante, todos los aislados demostraron poca importancia clínica [51]. Mientras tanto, *M. paragordoniae*, *M. septicum*, *M. llatzerense*, *M. seoulense*, *M. immunogenum*, *M. porcinum*, y *M. fortuitum* pueden producir infecciones pulmonares importantes [52–56]. Sin embargo, el riesgo de contagio para los trabajadores del sector acuícola es bajo, debido a que la infección

pulmonar se desarrolla por la ingesta del agua contaminada [57]. De igual manera, las MNT aisladas de *O. niloticus* no plantean riesgos importantes en términos de seguridad alimentaria, dado que estos pescados son sometidos a cocción antes de ser consumidos [34]. Por otro lado, aunque la mayoría de micobacterias aisladas en este estudio son consideradas micobacterias ambientales, la búsqueda y el hallazgo de nuevas MNT puede conllevar al descubrimiento de especies benéficas estimulantes del sistema inmune y para el desarrollo de tratamientos de enfermedades. Un ejemplo de esto es *M. vaccae*, que se está estudiando principalmente para su uso como agente inmunoterapéutico en el tratamiento de la tuberculosis, el cáncer, el asma, la dermatitis atópica y la psoriasis [58–62]. Del mismo modo, estudios realizados en ratas mencionan el potencial de *M. vaccae* en la microbiota intestinal para reducir el estrés mejorando la inmunomodulación en el sistema nervioso central y estimulando la producción de serotonina [63–65].

El tiempo de crecimiento de algunas colonias aisladas en el estudio difirió del tiempo reportado en artículos. *M. llatzerense*, *M. septicum*, *M. senegalense*/*M. farcinogenes*, *M. porcinum*, *M. vaccae*/*M. vanbaalenii*, *M. insubricum*, *M. immunogenum*, y *M. fortuitum* son clasificadas como MRC, pero, solamente los aislados SR-18, SR-21, SR-23, GC-44, GC-47 y GC-49 tardaron 7 días en crecer. Este resultado puede estar relacionado con la incubación de las muestras a temperatura ambiente empleado en el estudio, y de acuerdo con Runyon, algunas micobacterias pueden presentar crecimiento rápido a una temperatura de 37°C [11]. Por otro lado, la entidad de las colonias que dieron un porcentaje de identidad alto (98-100%) con dos especies, deben aclararse en estudios a futuro. Aunque el análisis del gen *16S rRNA* es ampliamente utilizado en la detección de micobacterias, la alta conservación de este gen limita su utilidad para diferenciar especies estrechamente relacionadas [8]. Por ejemplo, *M. paragordoniae* y *M. gordoniae* comparten un 99% de homología de secuencia del gen *16S rRNA* [66], de igual manera, *M. septicum* con *M. porcinum* y *M. senegalense* con *M. farcinogenes* están estrechamente relacionados [67]. Los objetivos genéticos para la detección molecular de micobacterias que pueden ser usados para la determinación específica a nivel de especie son la proteína de choque térmico 65 (*hsp65*) y los genes de la subunidad B de la ARN polimerasa (*rpoB*) [15].

CONCLUSIONES

Un total de seis especies fueron identificadas estrechamente relacionadas con *M. seoulense*, *M. septicum*, *M. llatzerense*, *M. immunogenum*, *M. insubricum*, y *M. fortuitum*, y ocho especies con homología identificadas como *M. paragordoniae/M. gordoniae*, *M. septicum/M. porcinum*, *M. senegalense/M. farcinogenes*, *M. vaccae/M. vanbaalenii*, de granjas de cultivo de *O. niloticus* ubicadas en el cantón Tena. Hasta la fecha, este es el primer estudio que informa sobre el aislamiento de MNT en cultivos de peces comerciales en el país.

Las especies *M. paragordoniae/M. gordoniae* y *M. fortuitum* son capaces de amenazar la piscicultura emergente de tilapias de Nilo de Napo por la inminente activación de la micobacteriosis ante factores de estrés.

El aislamiento de MNT a partir de las branquias demostró ser una alternativa factible para la recuperación de estos microorganismos y la prevención de futuros escenarios catastróficos en el sector piscícola.

Gran parte de las MNT identificadas son especies potencialmente patógenas para humanos inmunocompetentes e inmunocomprometidos. Por tal razón, los piscicultores deben establecer mejores medidas de manipulación para evitar la exposición directa de heridas abiertas con el agua y reducir el riesgo de lesiones causadas por las aletas

REFERENCIAS

1. Liao IC, Chao N-H. Aquaculture and food crisis: opportunities and constraints. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2009;18: 564–9.
2. FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. FAO; 2022. doi:10.4060/cc0461en
3. Ananda Raja R, Jithendran KP. Aquaculture Disease Diagnosis and Health Management. In: Perumal S, A.R. T, Pachiappan P, editors. *Advances in Marine and Brackishwater Aquaculture.* New Delhi: Springer India; 2015. pp. 247–255. doi:10.1007/978-81-322-2271-2_23
4. Miccoli A, Manni M, Picchiatti S, Scapigliati G. State-of-the-Art Vaccine Research for Aquaculture Use: The Case of Three Economically Relevant Fish Species. *Vaccines (Basel).* 2021;9: 140. doi:10.3390/vaccines9020140
5. Delghandi MR, El-Matbouli M, Menanteau-Ledouble S. Mycobacteriosis and Infections with Non-tuberculous Mycobacteria in Aquatic Organisms: A Review. *Microorganisms.* 2020;8: 1368. doi:10.3390/microorganisms8091368
6. Decostere A, Hermans K, Haesebrouck F. Piscine mycobacteriosis: a literature review covering the agent and the disease it causes in fish and humans. *Vet Microbiol.* 2004;99: 159–166. doi:10.1016/j.vetmic.2003.07.011
7. Jacobs JM, Stine CB, Baya AM, Kent ML. A review of mycobacteriosis in marine fish. *J Fish Dis.* 2009;32: 119–130. doi:10.1111/j.1365-2761.2008.01016.x
8. Gauthier D, Rhodes M. Mycobacteriosis in fishes: A review. *The Veterinary Journal.* 2009;180: 33–47. doi:10.1016/j.tvjl.2008.05.012
9. Austin B, Austin DA. *Bacterial Fish Pathogens.* Sixth. Springer Cham; 2016. doi:10.1007/978-3-319-32674-0
10. Slany M, Makovcova J, Jezek P, Bodnarova M, Pavlik I. Relative prevalence of *Mycobacterium marinum* in fish collected from aquaria and natural freshwaters in central Europe. *J Fish Dis.* 2014;37: 527–533. doi:10.1111/jfd.12135
11. Runyon EH. Anonymous Mycobacteria in Pulmonary Disease. *Medical Clinics of North America.* 1959;43: 273–290. doi:10.1016/S0025-7125(16)34193-1
12. Novotny L, Dvorska L, Lorencova A, Beran V, Pavlik I. Fish: a potential source of bacterial pathogens for human beings. *Vet Med (Praha).* 2004;49: 343–358.
13. Bhambri S, Bhambri A, Del Rosso JQ. Atypical Mycobacterial Cutaneous Infections. *Dermatol Clin.* 2009;27: 63–73. doi:10.1016/j.det.2008.07.009
14. Valdés F, Cid A. Micobacterias atípicas. *Actas Dermosifiliogr.* 2004;95: 331–357. doi:10.1016/S0001-7310(04)76833-7
15. Zhang DF, Ji C, Zhang XJ, Li TT, Li AH, Gong XN. Mixed mycobacterial infections in farmed sturgeons. *Aquac Res.* 2015;46: 1914–1923. doi:10.1111/are.12346
16. Zhang Q, Wang X, Zhang D, Long M, Wu Z, Feng Y, et al. De novo Assembly and Analysis of Amur Sturgeon (*Acipenser schrenckii*) Transcriptome in Response to *Mycobacterium Marinum* Infection to

- Identify Putative Genes Involved in Immunity. *J Microbiol Biotechnol*. 2019;29: 1324–1334. doi:10.4014/jmb.1903.03034
17. Romano LA, Sampaio LA, Tesser MB. Micobacteriose por *Mycobacterium marinum* em “linguado” *Paralichthys orbignyanus* e em “barber goby” *Elacatinus figaro*: diagnóstico histopatológico e imuno-histoquímico. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2012;32: 254–258. doi:10.1590/S0100-736X2012000300013
 18. Aro L, Correa K, Martínez A, Ildefonso R, Yáñez JM. Characterization of *Mycobacterium salmoniphilum* as causal agent of mycobacteriosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., from a freshwater recirculation system. *J Fish Dis*. 2014;37: 341–348. doi:10.1111/jfd.12108
 19. Lara-Flores M, Aguirre-Guzman G, Balan-Zetina SB, Sonda-Santos KY, Zapata AA. Identification of *Mycobacterium* Agent Isolated from Tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Turk J Fish Aquat Sci*. 2014;14. doi:10.4194/1303-2712-v14_2_29
 20. Ramírez P, Luna M, Ruilova M, Avila J, Bucheli S, Castro J. Análisis económico financiero y de sensibilidad de la producción de tilapia (*Oreochromis* spp.) En la región Amazónica Ecuatoriana. *Journal of Science and Research*. 2021;6: 205–225.
 21. Yanong RPE. Necropsy techniques for fish. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. 2003;12: 89–105. doi:10.1053/saep.2003.127885
 22. Ambrosio SR, de Deus Oliveira EM, Rodriguez CA, Ferreira Neto JS, Amaku M. Comparison of three decontamination methods for *Mycobacterium bovis* isolation. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2008;39: 241–244. doi:10.1590/S1517-83822008000200008
 23. Brian A, Baker F. *Mycobacteria* Butterworths & Co. Publishers. 1968.
 24. Gauthier D, Rhodes M, Vogelbein W, Kator H, Ottinger C. Experimental mycobacteriosis in striped bass *Morone saxatilis*. *Dis Aquat Organ*. 2003;54: 105–117. doi:10.3354/dao054105
 25. Koentjoro MP, Donastin A, Prasetyo EN. A simple method of DNA extraction of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum cultures for sequencing analysis. *Afr J Infect Dis*. 2021;15: 19–22. doi:https://doi.org/10.21010/ajidv15i2S:2
 26. Ledesma Y, Echeverría G, Claro-Almea FE, Silva D, Guerrero-Freire S, Rojas Y, et al. The Re-Identification of Previously Unidentifiable Clinical Non-Tuberculous *Mycobacterial* Isolates Shows Great Species Diversity and the Presence of Other Acid-Fast Genera. *Pathogens*. 2022;11: 1159. doi:10.3390/pathogens11101159
 27. Hernandez SM, Morlock GP, Butler WR, Crawford JT, Cooksey RC. Identification of *Mycobacterium* Species by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analyses Using Fluorescence Capillary Electrophoresis. *J Clin Microbiol*. 1999;37: 3688–3692. doi:10.1128/JCM.37.11.3688-3692.1999
 28. Cooksey RC, de Waard JH, Yakrus MA, Rivera I, Chopite M, Toney SR, et al. *Mycobacterium cosmeticum* sp. nov., a novel rapidly growing species isolated from a cosmetic infection and from a nail salon. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004;54: 2385–2391. doi:10.1099/ijs.0.63238-0
 29. Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol*. 2021;38: 3022–3027. doi:10.1093/molbev/msab120
 30. Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. A Greedy Algorithm for Aligning DNA Sequences. *Journal of Computational Biology*. 2000;7: 203–214. doi:10.1089/10665270050081478

31. Sayers EW, Bolton EE, Brister JR, Canese K, Chan J, Comeau DC, et al. Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Res.* 2022;50: D20–D26. doi:10.1093/nar/gkab1112
32. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004;32: 1792–1797. doi:10.1093/nar/gkh340
33. Guivier E, Pech N, Chappaz R, Gilles A. Microbiota associated with the skin, gills, and gut of the fish *Parachondrostoma toxostoma* from the Rhône basin. *Freshw Biol.* 2020;65: 446–459. doi:10.1111/fwb.13437
34. Sevim P, Ozer S, Rad F. First isolation of *Mycobacterium* spp. in *Mullus* spp. in Turkey. *Iran J Vet Res.* 2015;16: 144–149.
35. Gcebe N, Michel AL, Hlokwé TM. Non-tuberculous *Mycobacterium* species causing mycobacteriosis in farmed aquatic animals of South Africa. *BMC Microbiol.* 2018;18: 32. doi:10.1186/s12866-018-1177-9
36. Strike TB, Feltre Y, Flach E, Macgregor SK, Guillaume S. Investigation and management of an outbreak of multispecies mycobacteriosis in Australian lungfish (*Neoceratodus fosteri*) including the use of triple antibiotic treatment. *J Fish Dis.* 2017;40: 557–570. doi:10.1111/jfd.12535
37. Lulijwa R, Rupia EJ, Alfaro AC. Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: a review of the top 15 major producers. *Rev Aquac.* 2020;12: 640–663. doi:10.1111/raq.12344
38. Ponce-Granillo C, Monroy-Dosta M, Becerril-Cortés D, Castro-Mejía J, Ocampo-Cervantes J. Potential use in aquaculture of *Rhodococcus* sp. (Zopf, 1891). *Revista Digital E Bios.* 2016;1: 1–6.
39. Sakai M, Kono T, Tassakka ACMAR, Ponpornpisit A, Areechon N, Katagiri T, et al. Characterization of a *Mycobacterium* sp. isolated from guppy *Poecilia reticulata*, using 16S ribosomal RNA and its internal transcribed spacer sequences. *Bull Eur Assoc Fish Pathol.* 2005;25: 64–69.
40. Machida Y, Tang BCC, Yamada M, Sato S, Nakajima K, Matoyama H, et al. Mycobacteriosis in cultured koi carp *Cyprinus carpio* caused by *Mycobacterium paragordonae* and two *Mycobacterium* spp. *Aquaculture.* 2021;539: 736656. doi:10.1016/j.aquaculture.2021.736656
41. Pate M, Jencic V, Zolnir-Dovc M, Ocepek M. Detection of mycobacteria in aquarium fish in Slovenia by culture and molecular methods. *Dis Aquat Organ.* 2005;64: 29–35. doi:10.3354/dao064029
42. Perez AT, Conroy DA, Quiñones L. Presence of acid-fast bacteria in wild and cultured silver mullets (*Mugil curema* val., 1836) from Margarita Island, Venezuela. *Interciencia.* 2001;26: 252–256. Available: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33905705>
43. Talaat AM, Trucksis M, Kane AS, Reimschuessel R. Pathogenicity of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium smegmatis* to goldfish, *Carassius auratus*. *Vet Microbiol.* 1999;66: 151–164. doi:10.1016/S0378-1135(99)00002-4
44. Johansen MD, Kremer L. CFTR Depletion Confers Hypersusceptibility to *Mycobacterium fortuitum* in a Zebrafish Model. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10. doi:10.3389/fcimb.2020.00357
45. Chang H-Y, Tsai W-C, Lee T-F, Sheng W-H. *Mycobacterium gordonae* infection in immunocompromised and immunocompetent hosts: A series of seven cases and literature review. *Journal of the Formosan Medical Association.* 2021;120: 524–532. doi:10.1016/j.jfma.2020.06.029

46. Brown-Elliott BA, Wallace RJ, Tichindelean C, Sarria JC, McNulty S, Vasireddy R, et al. Five-Year Outbreak of Community- and Hospital-Acquired *Mycobacterium porcinum* Infections Related to Public Water Supplies. *J Clin Microbiol.* 2011;49: 4231–4238. doi:10.1128/JCM.05122-11
47. Cheng A-Y, Lee C-H. Skin infection by *Mycobacterium farcinogenes*–*senegalense* group in an immunocompetent patient: a case report. *BMC Infect Dis.* 2022;22: 445. doi:10.1186/s12879-022-07409-z
48. Sethi S, Arora S, Gupta V, Kumar S. Cutaneous *Mycobacterium fortuitum* infection: Successfully treated with amikacin and ofloxacin combination. *Indian J Dermatol.* 2014;59: 383–384. doi:10.4103/0019-5154.135491
49. Chung J, Ince D, Ford BA, Wanat KA. Cutaneous Infections Due to Nontuberculosis *Mycobacterium*: Recognition and Management. *Am J Clin Dermatol.* 2018;19: 867–878. doi:10.1007/s40257-018-0382-5
50. Torosian A, Ly L, Murina A, Bitar C. A case of cutaneous *Mycobacterium* *llatzerense*. *JAAD Case Rep.* 2023;31: 53–55. doi:10.1016/j.jdcrr.2022.11.005
51. Tortoli E, Baruzzo S, Heijdra Y, Klenk H-P, Lauria S, Mariottini A, et al. *Mycobacterium insubricum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2009;59: 1518–1523. doi:10.1099/ijs.0.003459-0
52. Li Y, Zhang W, Zhao J, Lai W, Zhao Y, Li Y, et al. *Mycobacterium paragordoniae* is an emerging pathogen in human pulmonary disease: clinical features, antimicrobial susceptibility testing and outcomes. *Emerg Microbes Infect.* 2022;11: 1973–1981. doi:10.1080/22221751.2022.2103453
53. Go JR, Wengenack NL, Abu Saleh OM, Corsini Campioli C, Deml SM, Wilson JW. *Mycobacterium* *septicum*: a 6-Year Clinical Experience from a Tertiary Hospital and Reference Laboratory. *J Clin Microbiol.* 2020;58: e02091-20. doi:10.1128/JCM.02091-20
54. Sungkapalee T, Ellison RT, Brown-Elliott BA, Vasireddy R, Jr RJW. Persistent *Mycobacterium seoulense* pulmonary disease. *International Journal of Infectious Diseases. International Journal of Infectious Diseases*; 2012. pp. e158–e316. doi:10.1016/j.ijid.2012.05.977
55. Teixeira L, Avery RK, Iseman M, Arrossi AV, Harrington S, Stephens K, et al. *Mycobacterium* *llatzerense* Lung Infection in a Liver Transplant Recipient: Case Report and Review of the Literature. *American Journal of Transplantation.* 2013;13: 2198–2200. doi:10.1111/ajt.12318
56. Park S, Suh GY, Chung MP, Kim H, Kwon OJ, Lee KS, et al. Clinical significance of *Mycobacterium fortuitum* isolated from respiratory specimens. *Respir Med.* 2008;102: 437–442. doi:10.1016/j.rmed.2007.10.005
57. Whiley H, Keegan A, Giglio S, Bentham R. *Mycobacterium avium* complex - the role of potable water in disease transmission. *J Appl Microbiol.* 2012;113: 223–232. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05298.x
58. Balagon M V., Walsh DS, Tan PL, Cellona R V., Abalos RM, Tan E V., et al. Improvement in psoriasis after intradermal administration of heat-killed *Mycobacterium vaccae*. *Int J Dermatol.* 2000;39: 51–58. doi:10.1046/j.1365-4362.2000.00862.x
59. Hadley EA, Smillie FI, Turner MA, Custovic A, Woodcock A, Arkwright PD. Effect of *Mycobacterium vaccae* on cytokine responses in children with atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol.* 2005;140: 101–108. doi:10.1111/j.1365-2249.2005.02743.x

60. Stanford JL, Stanford CA, O'Brien MER, Grange JM. Successful immunotherapy with *Mycobacterium vaccae* in the treatment of adenocarcinoma of the lung. *Eur J Cancer*. 2008;44: 224–227. doi:10.1016/j.ejca.2007.08.021
61. Jiang X-H, Li C-Q, Feng G-Y, Luo M-J, Sun Q-X, Huang J. *Mycobacterium vaccae* nebulization protects Balb/c mice against bronchial asthma through neural mechanisms. *Journal of Asthma*. 2021;58: 1003–1012. doi:10.1080/02770903.2020.1761381
62. Yang X-Y, Chen Q-F, Li Y-P, Wu S-M. *Mycobacterium vaccae* as Adjuvant Therapy to Anti-Tuberculosis Chemotherapy in Never-Treated Tuberculosis Patients: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2011;6: e23826. doi:10.1371/journal.pone.0023826
63. Frank MG, Fonken LK, Dolzani SD, Annis JL, Siebler PH, Schmidt D, et al. Immunization with *Mycobacterium vaccae* induces an anti-inflammatory milieu in the CNS: Attenuation of stress-induced microglial priming, alarmins and anxiety-like behavior. *Brain Behav Immun*. 2018;73: 352–363. doi:10.1016/j.bbi.2018.05.020
64. Fox JH, Hassell JE, Siebler PH, Arnold MR, Lamb AK, Smith DG, et al. Preimmunization with a heat-killed preparation of *Mycobacterium vaccae* enhances fear extinction in the fear-potentiated startle paradigm. *Brain Behav Immun*. 2017;66: 70–84. doi:10.1016/j.bbi.2017.08.014
65. Matthews DM, Jenks SM. Ingestion of *Mycobacterium vaccae* decreases anxiety-related behavior and improves learning in mice. *Behavioural Processes*. 2013;96: 27–35. doi:10.1016/j.beproc.2013.02.007
66. Kim B-J, Hong S-H, Kook Y-H, Kim B-J. *Mycobacterium paragordonae* sp. nov., a slowly growing, scotochromogenic species closely related to *Mycobacterium gordonae*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2014;64: 39–45. doi:10.1099/ijs.0.051540-0
67. Adékambi T, Drancourt M. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, hsp65, sodA, recA and rpoB gene sequencing. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004;54: 2095–2105. doi:10.1099/ijs.0.63094-0