



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD CIENCIAS DE LA VIDA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**COMPARACIÓN DE METODOLOGÍAS PARA INCREMENTAR EL
NÚMERO DE AISLAMIENTOS DE MICOBACTERIAS ATÍPICAS
EN MUESTRAS DE ÓRGANOS DE TILAPIAS (*OREOCHROMIS
NILOTICUS*)**

Proyecto de investigación previo a la obtención del Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORES: SARAI JOSABETH GAIBOR COBOS,

LENIN FERNANDO VÁSQUEZ TORRES

TUTOR: Mgs. YEIMY MARLENE ROJAS DE HIDALGO

Napo - Ecuador

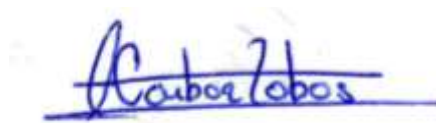
2024

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Yo, Sarai Josabeth Gaibor Cobos con documento de identidad N°1727559385 declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título Ingeniería 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 el presente documento son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Tena, 01 de marzo de 2024



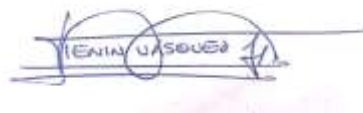
Sarai Josabeth Gaibor Cobos
1727559385

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Yo, Lenin Fernando Vásquez Torres con documento de identidad N° 1723603120 declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título Ingeniería 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 el presente documento son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Tena, 01 de marzo de 2024



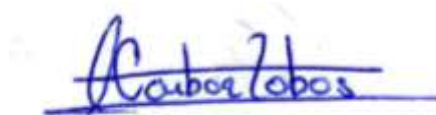
Lenin Fernando Vásquez Torres
1723603120

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, Sarai Josabeth Gaibor Cobos, con documento de identidad N°1727559385, en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: “Comparación de metodologías para incrementar el número de aislamientos de micobacterias atípicas en muestras de órganos de tilapias (*Oreochromis niloticus*)”, 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, 01 de marzo de 2024



Sarai Josabeth Gaibor Cobos

1727559385

AUTORIZACION DE PUBLICACION EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, Lenin Fernando Vásquez Torres, con documento de identidad N°1723603120, en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: “Comparación de metodologías para incrementar el número de aislamientos de micobacterias atípicas en muestras de órganos de tilapias (*Oreochromis niloticus*)”, 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, 01 de marzo de 2024

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'LENIN VASQUEZ', is written over a horizontal line. The signature is stylized with loops and a final flourish.

Lenin Fernando Vásquez Torres
1723603120

Unidad de Titulación
Carrera Ingeniería en Biotecnología
CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Certifico que el Trabajo de Integración Curricular Titulado: “Comparación de metodologías para incrementar el número de aislamientos de micobacterias atípicas en muestras de órganos de tilapias (*Oreochromis niloticus*)”, en la modalidad: tesis, fue realizado por: Sarai Josabeth Gaibor Cobos y Lenin Fernando Vásquez Torres, 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, 01 de marzo de 2024



Mgs. Rojas de Hidalgo Yeimy Marlene
C.I: 1757847783

DEDICATORIA

En memoria de mi abuelita, Germania,
por todo el amor y sabiduría que generosamente compartiste conmigo

Sarai Gaibor

AGRADECIMIENTO

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a la Mgs. Yeimy Rojas por brindarme la oportunidad de trabajar junto a ella, valorando cada aporte y enseñanza que han enriquecido mi experiencia como estudiante.

Así mismo, estoy sumamente agradecida con Andrea Castro y Marcos Hidalgo por el apoyo que me brindaron, tanto en aspecto práctico como teórico, durante la ejecución de esta investigación. Cada aporte fue fundamental para el desarrollo y éxito de este proyecto.

A mis amigos, Michell Salcán, Ruth Guevara, Ricardo Caiza, Alberto Robles, Lenin Vásquez, Keneth Llerena y Cinthya Berrones, por sus palabras de aliento para seguir adelante. Sus aportes ante las dudas que surgieron a lo largo de mi carrera universitaria han sido una contribución importante para mi desarrollo académico.

Agradezco a mi familia por el apoyo incondicional que me brindaron. Mi hermano Mathew Gaibor, quien ha estado constantemente a mi lado, no sólo resolviendo mis inquietudes académicas, sino también brindándome consejos en cuestiones personales. Llegar hasta este punto en cierta parte se debe a que no permitiste que me rindiera.

Sarai Gaibor

DEDICATORIA

"A mis amados padres, Miriam Torres y Fernando Vásquez, quienes han sido la fuente inagotable de apoyo incondicional a lo largo de mi travesía académica. Sus palabras alentadoras, amor infinito y constante orientación han sido el faro que ilumina mi camino. Este logro no solo es mío, sino también de ustedes, quienes han sembrado en mí la semilla del esfuerzo y la perseverancia. Gracias por ser mis pilares inquebrantables. Este trabajo está dedicado con profundo amor y gratitud."

Lenin Vásquez

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a la Mgs. Yeimy Rojas, quien me ha guiado desde el primer momento. Su apoyo académico ha sido fundamental en cada paso de este camino.

Así mismo agradezco de manera especial a Carolina Castro, técnica de laboratorio, por su constante respaldo y valiosos consejos en la parte práctica de mi tesis. Su dedicación ha sido fundamental en mi trayectoria académica.

No puedo pasar por alto el apoyo sincero y la amistad incondicional de mis amigos: Sarai Gaibor, Dayana Montesdeoca, Carlos Ortiz, Ismael Prado, Juan Carlos Carrera y Jairo Quimbita. Su compañía ha hecho este viaje más significativo.

Mi agradecimiento especial va para mi amiga y confidente, Ruth Guevara. Gracias por tu apoyo constante, por escucharme en todo momento y compartir tantas anécdotas, Tu amistad sincera ha sido un regalo invaluable.

Finalmente, mi gratitud eterna a mi familia por su apoyo constante. Su amor y aliento han sido el motor que impulsa mis logros académicos.

Lenin Vásquez

TABLA DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD.....	iii
AUTORIZACION DE PUBLICACION EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	iv
AUTORIZACION DE PUBLICACION EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	v
CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN	vi
DEDICATORIA	vii
AGRADECIMIENTO	viii
DEDICATORIA	ix
AGRADECIMIENTO	x
TABLA DE CONTENIDOS	xi
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiii
ÍNDICE DE GRÁFICOS O FIGURAS.....	xiv
ÍNDICE DE ANEXOS	xv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xvii
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.1.1 Género Mycobacterium	1
1.1.2 Patogenicidad de las MNT.....	1
1.1.3 Especies afectadas	2
1.1.4 Formas de transmisión	3
1.1.5 Signos Clínicos.....	3
1.1.6 Diagnóstico de MNT	4
1.1.7 Aislamiento y cultivo de MNT.....	5
1.2 Planteamiento del problema	6
1.3 Justificación de la investigación.....	7
1.4 Objetivos de la investigación	8
1.4.1 General	8
1.4.2 Específicos.....	8
CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO	9
2.1 Medio de cultivo TSB con antibiótico (Medio A)	9
2.2 Medio de cultivo Lowenstein-Jensen (Medio B).....	9

2.3	Procesamiento de muestra y obtención de órganos	9
2.3.1	<i>Diseño Experimental</i>	10
2.3.2	<i>Grupo Control</i>	10
2.4	Descontaminación con HPC y NaOH (Método 1)	10
2.5	Descontaminación con NaOH y HCl (Método 2)	11
2.6	Descripción fenotípica y análisis de coloración	11
2.7	Extracción de ADN	12
2.8	PCR de muestras de ADN de micobacterias atípicas y electroforesis	13
2.9	Secuenciación y análisis en el software Mega.....	13
2.10	Análisis estadístico	14
2.10.1	<i>Test de independencia Chi cuadrado</i>	14
2.10.2	<i>Estadístico Z para la proporción de muestra</i>	14
CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE RESULTADOS		15
3.1	Análisis de dependencia entre variables categóricas e incidencia de micobacterias no tuberculosas (MNT) utilizando chi-cuadrado	15
3.2	Comparación de las observaciones que muestran presencia de micobacterias no tuberculosas (MNT) en relación con las variables independientes	16
3.3	Estadístico Z para la proporción de una muestra.....	16
3.4	Análisis fenotípico de Tilapias del nilo: individuos sanos y enfermos	17
3.5	Análisis fenotípico de MNT presente en muestras procesadas.....	19
3.6	Análisis genotípico de MNT presente en muestras procesadas.....	20
3.7	Identificación celular microscópico de las Micobacterias no tuberculosas por Ziehl Neelsen	22
CAPÍTULO VI: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN		23
4.1	Optimización de métodos de descontaminación: Análisis entre método 1 (HPC 1% + NaOH 4%) y método 2 (NaOH 4% + HCl 1%).....	23
4.2	Análisis entre medios de cultivo Lowenstein-Jensen (LJ) y TSB + antibiótico	24
4.3	Análisis de la presencia de micobacterias no tuberculosas (MNT) en órganos internos (bazo, riñón e hígado) y branquias	25
4.4	Análisis de la identificación celular microscópico de las Micobacterias no tuberculosas por Ziehl Neelsen	25
4.5	Análisis de la identificación genotípica de especies de MNT	26
CAPÍTULO V: CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES		29
REFERENCIAS		
ANEXOS		

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones de PCR para el gen 16S.	13
Tabla 2. Estadística Z proporcional con p-valor para la comparación entre métodos, contaminación, medios y órganos.....	17
Tabla 3. Especie de micobacterias no tuberculosas obtenidas y sus características de crecimiento.	21

ÍNDICE DE GRÁFICOS O FIGURAS

Figura 1.	Relación entre la variable dependiente (micobacterias no tuberculosas) y las variables independientes (método, medio, órgano).....	15
Figura 2.	Comparación de la presencia de micobacterias	16
Figura 3.	Tilapia número 63, individuo sano.	17
Figura 4.	Tilapias enfermas.	18
Figura 5.	Presencia de colonias en muestras procesadas, procedentes de órganos internos y de branquias	19
Figura 6.	Muestras procesadas utilizadas como control positivo	20
Figura 7.	Tinción Ziehl Neelsen de <i>M. sp</i> y <i>M. fortuitum</i>	20
Figura 8.	inción Ziehl Neelsen de <i>M. abscessus</i>	22

ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo 1. Diseño experimental
- Anexo 2. Tabla de datos resumida

RESUMEN

La piscicultura artesanal, al descuidar medidas de bioseguridad, expone a los trabajadores a infecciones por Micobacterias no tuberculosas (MNT) presentes en aguas, suelos y animales. Identificar fuentes de infección previene pérdidas en la producción acuícola. Dada su complejidad, mejoras en el pretratamiento de muestras, selección del medio de cultivo y optimización del trabajo en el laboratorio son esenciales. En esta investigación se compararon dos metodologías de pretratamiento y cultivos para evaluar la eficiencia de aislamiento de MNT. Se analizaron 68 tilapias de tres puntos de expendio en Tena. Branquias y órganos internos se maceraron en PBS 1X. El sobrenadante se dividió en dos alícuotas, sometándose a dos métodos de descontaminación (M1 y M2). M1 usa NaOH 4%, mientras que M2 añade HCl 1%. Posterior al pretratamiento, se inocularon en medio Lowenstein Jensen (LJ) y medio Caldo Soya Tripticasa (TSB) con antibióticos. El gen 16S rRNA se secuenció para identificar especies de MNT. Se identificó que 50 de ellos dieron positivo para la presencia de (MNT), lo que representa un 73.52% de positividad. En conjunto de las variables analizadas, se obtuvieron 544 observaciones. De estas, el 36.40% presentaron resultados positivos para M2, mientras que un 23.90% para M1. Respecto a los medios de cultivo, LJ presentó un 17.10% de positividad, a diferencia del medio TSB que mostró un 13.05%. Además, se registraron muestras positivas con un 11.40% en órganos internos y un 18.75% en branquias. La contaminación que se presentó para el M1 fue de 5.15 %, mientras que en el M2 de 6.25%. Entre las especies identificadas tenemos: *Mycobacterium fortuitum*, *M. paragordoniae*, *M. cosmeticum*, *M. abscessus*, *M. porcinum* y *M. sp.* El método 2, con HCl 1% como neutralizante, demostró mayor eficiencia en la recuperación de MNT, siendo además más rápido. Aunque se observó contaminación estadísticamente significativa en el método 2, no afectó la obtención de MNT. Los medios de cultivo LJ y TSB+A mostraron porcentajes de positividad similares para la obtención de MNT.

Palabras clave: Micobacterias atípicas, tilapia (*Oreochromis niloticus*), descontaminación, TSB, Lowenstein Jensen.

ABSTRACT

Artisanal fish farming, by neglecting biosecurity measures, exposes workers to non-tuberculous mycobacteria (NTM) infections in water, soil and animals. Identifying sources of infection prevents losses in aquaculture production. Given its complexity, improvements in sample pretreatment, selection of the culture medium and optimization of laboratory work are essential. In this research, two pretreatment methodologies and cultures were compared to evaluate the efficiency of NTM isolation. We analyzed 68 tilapias from three stations in Tena. Gills and internal organs were macerated in PBS 1X. The supernatant was divided into two aliquots, undergoing two decontamination methods (M1 and M2). M1 uses NaOH 4%, while M2 adds HCl 1%. After pretreatment, Lowenstein Jensen (LJ) and Soya Trypticase Broth (TSB) were inoculated with antibiotics. The 16S rRNA gene was sequenced to identify MNT species. It was identified that 50 of them tested positive for the presence of (NTM), which represents 73.52% of positivity. In total, 544 observations were obtained. Of these, 36.40% presented positive results for M2, while 23.90% for M1. Regarding the culture media, LJ presented a 17.10% positivity, unlike the TSB medium which showed a 13.05%. In addition, positive samples were recorded with 11.40% in internal organs and 18.75% in gills. The contamination presented for the M1 was 5.15%, while in the M2 of 6.25%. Among the species identified we have: *Mycobacterium fortuitum*, *M. paragordoniae*, *M. cosmeticum*, *M. abscessus*, *M. porcinum* and *M. sp.* Method 2, with 1% HCl as neutralizer, showed greater efficiency in the recovery of MNT, being also faster. Although statistically significant contamination was observed in Method 2, it did not affect NTM. The culture media LJ and TSB+A showed similar percentages of positivity to obtain NTM.

Keywords: Atypical mycobacteria, tilapia (*Oreochromis niloticus*), descontamination, TSB, Lowenstein Jensen.

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Antecedentes

1.1.1 Género *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium*, perteneciente a la familia *Mycobacteriaceae*, constituye un grupo especializado de bacterias las cuales se caracterizan por la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR), aerobios Gram (+), inmóviles y no esporulados que miden entre 0.2-0.6 por 1-10 μm , poseen un alto contenido de lípidos en su pared. Específicamente, la presencia de ácidos grasos de cadena larga, como los ácidos micólicos y el lipoarabinomano (LAM) que hacen que la pared celular sea impenetrable e hidrofóbica, contribuyendo a la resistencia y virulencia de las micobacterias (Jankute et al., 2015; Ryan & Ray, 2017). El compuesto clave para la resistencia al ácido alcohol es el ácido micólico, una fracción lipídica exclusiva de las micobacterias. El ácido micólico forma un complejo con el peptidoglicano en la pared de las micobacterias que impide de alguna manera el contacto con el disolvente ácido alcohol en la etapa de la decoloración en la tinción (Kaattari et al., 2006).

Estas bacterias se distribuyen principalmente en suelo, agua y animales. Algunas especies de *Mycobacterium* son patógenas para los humanos causando graves enfermedades como la tuberculosis y la lepra (*M. tuberculosis* y *M. leprae*). Además de estas especies, existen micobacterias no tuberculosas (MNT), que se consideran patógenas emergentes causando infecciones oportunistas en pacientes inmunocomprometidos. Entre estas MNT se incluyen especies como *M. avium*, *M. gordonae*, *M. abscessus*, *M. marinum* y *M. fortuitum* (Delghandi et al., 2020).

1.1.2 Patogenicidad de las MNT

Dentro del contexto de las micobacterias no tuberculosas, se ha reportado su capacidad para afectar a diferentes especies acuáticas, incluyendo peces (Gcebe et al., 2018). La presencia de estas MNT como *M. marinum*, *M. chelonae* y *M. fortuitum*, que son patógenos de alta incidencia, se ha convertido en un asunto de interés en la acuicultura y la industria de los peces de acuario. Estas bacterias pueden desencadenar

enfermedades sistémicas, crónicas y progresivas conocidas como micobacteriosis (Akbari et al., 2014; Valdés & Cid, 2004). Los síntomas de esta enfermedad en peces, incluyen decoloración de piel, presencia de úlceras cutáneas, deformidad en aletas, y formación de granulomas grises o blancos en órganos internos, además, se observa una hipertrofia de bazo, riñón e hígado (Delghandi et al., 2020 ; Beran et al., 2006). La creciente preocupación por los efectos que el género *Mycobacterium* puede causar tanto en animales como en humanos, ha generado la necesidad de utilizar métodos para diagnosticar micobacteriosis, identificar en muestras clínicas la especie involucrada en la infección y determinar las fuentes de infección para establecer medidas de prevención.

1.1.3 Especies afectadas

La micobacteriosis es ocasionada por distintas especies de MNT. Von Betegh en 1910 fue el primero en informar la presencia de *M. marinum* en peces marinos donde se detectó lesiones parecidas a la tuberculosis en hígado, bazo y riñón de peces de arrecife de coral (Hashish et al., 2018). En un principio se creía que esta enfermedad afectaba únicamente a peces marinos, pero con el tiempo se ha aislado también en especies de agua dulce y en seres humanos (Beran et al., 2006).

La susceptibilidad a la micobacteriosis abarca prácticamente todas las especies de peces de agua dulce y salada, como se ha documentado en diversos estudios. Específicamente, se ha observado que miembros de las familias de peces de agua dulce, como *Anabantidae* (bettas y gouramis), *Characidae* (tetras y pirañas) y *Cyprinidae* (danios y barbus), son particularmente propensos a la infección (Decostere et al., 2004).

En los últimos años, se ha incrementado la incidencia de la infección por micobacterias en peces cultivados, abarcando especies como el salmón chinook, róbalo común, peces ornamentales de agua dulce, esturión y róbalo. De igual manera en especies destinadas al cultivo extensivo como *Oreochromis niloticus* y *Oreochromis mossambicus*. Además, se ha registrado casos de micobacteriosis en peces silvestres, como el bacalao, el lenguado, el róbalo rayado y la perca amarilla, lo que resalta la relevancia de este patógeno en la acuicultura (Gauthier & Rhodes, 2009).

1.1.4 Formas de transmisión

Las MNT son patógenos oportunistas cuya capacidad de infección se ve incrementada por factores como el estrés por manipulación, confinamiento y transporte (Decostere et al., 2004). Los reservorios incluyen agua contaminada, peces portadores, fómites, alimento contaminado y detritus acuático. Los caracoles, invertebrados y algunos vertebrados acuáticos, como ranas y tortugas, desempeñan un papel en la transmisión (Francis-Floyd, 2011).

La infección, principalmente por medio de alimento contaminado, ha sido registrada en estudios que destacan a las micobacterias ubicadas en lesiones granulomatosas. Investigaciones revelan casos de infección a través de pulgas de agua y amebas ambientales, actuando como vectores de transmisión (Spickler, 2007). La micobacteriosis también puede ser transmitida por protozoos ciliados, como *Paramecium caudatum*, que son comunes en las larvas de peces. En el pez arroz japonés, la rápida infección se atribuye a larvas de mosquito contaminadas con *M. marinum* (Vatsos et al., 2006). La transmisión eficaz en algunas especies, como el pez cebra, puede requerir la infección a través de amebas (Harrieff et al., 2007; Slany et al., 2014).

La micobacteriosis se propaga por vía horizontal a través del agua, peces muertos, peces infectados y fómites. Las MNT poseen una notable capacidad para adaptarse y mantener su patogenicidad en diversos entornos acuáticos (Peterson et al., 2013). La transmisión vertical se evidencia en la reproducción de peces, donde las micobacterias pueden aislarse de fluidos ováricos y la superficie mucosa de los huevos (Decostere et al., 2004). Además, la infección puede transmitirse por contacto directo con material infeccioso o la ingesta de tejido infectado, como se observó en la industria del salmón (Hashish et al., 2018; Vatsos et al., 2006).

1.1.5 Signos Clínicos

La micobacteriosis en peces se manifiesta como una enfermedad crónica que exhibe una sintomatología tanto externa como interna en los animales afectados (Pate et al., 2005). Los signos clínicos presentan una variabilidad en su presentación, tanto en la gravedad como en la localización del daño, siendo inespecíficos y con un patrón diverso

(Ranzani-Paiva et al., 2004). Las manifestaciones a nivel cutáneo incluyen lesiones erosivas, úlceras hemorrágicas, inflamación, descamación y emaciación progresiva (Jernigan & Farr, 2000; Ucko et al., 2002). Además, se observa un deterioro en las aletas, depresión, anorexia, letargo, distensión abdominal, nado errático y permanencia en el fondo, decoloración de la piel, deformidades óseas, como curvatura de la columna o malformaciones, branquias pálidas, nado anormal y disminuido (Decostere et al., 2004; Francis-Floyd, 2011). Estos signos clínicos se asocian comúnmente con factores estresantes en los peces, como el hacinamiento, mala nutrición, variación de la temperatura, mala calidad del agua y manipulación inadecuada (Hashish et al., 2018).

En la infección por micobacterias, la expresión de signos clínicos puede ser variable, desde la ausencia de síntomas hasta manifestaciones similares a otras enfermedades en peces. La incubación juega un papel vital, con períodos que abarcan desde una evolución crónica de varios años hasta una muerte súbita (Barato & Penagos, 2014). La forma aguda, aunque poco común, se caracteriza por una morbilidad y mortalidad rápidas con escasos signos clínicos (Zanoni et al., 2008).

A nivel interno, las micobacterias pueden causar granulomas en diferentes órganos, como bazo, riñón, hígado e intersticios renales, con implicaciones graves en la función de estos órganos (Francis-Floyd, 2011; Valera A. et al., 2018). También se han observado granulomas en intersticios renales, con lesiones extensas que comprimen estructuras capilares peritubulares, causando daño por anoxia.

1.1.6 Diagnóstico de MNT

El diagnóstico de la micobacteriosis se basa en la evaluación de los signos clínicos, histológicos y la identificación del patógeno. La sospecha de micobacteriosis surge ante la presencia de pérdida de peso o condición, especialmente acompañada de pérdida de escamas, lesiones hemorrágicas inespecíficas o úlceras (Spickler, 2007). La identificación microscópica del patógeno se realiza mediante un frotis de la superficie de corte de bazo, riñón o lesiones cutáneas, teñido con la técnica de Ziehl-Neelsen, que destaca las micobacterias en secciones de tejido (Gauthier & Rhodes, 2009).

La tinción de Ziehl-Neelsen, utilizada rutinariamente en el diagnóstico de la tuberculosis, se destaca por su rapidez, simplicidad y economía, con una sensibilidad del 74% y

especificidad del 98% para identificar bacilos ácido-alcohol resistentes, con un límite de detección de 5.000-10.000 bacilos/ml de muestra (Francis-Floyd, 2011; López-Jácome et al., 2014). La presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes, visualizados con coloración roja fucsia, indica una tinción positiva. Además, se pueden aplicar técnicas inmunológicas como la inmunofluorescencia, peroxidasa o hibridación in situ (Hashish et al., 2018).

El diagnóstico definitivo implica el aislamiento del patógeno, que puede resultar desafiante debido a la lenta proliferación de algunas especies. El cultivo a 20-30 °C puede requerir de 2 a 30 días, y la morfología celular no presenta características visibles distintivas. La inmunocitoquímica puede ofrecer mayor sensibilidad, pero no identifica la especie (Antuofermo et al., 2017). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posterior secuenciación se presenta como una alternativa para la identificación de la micobacteria, siendo útil para detectar la especie y determinar el pronóstico y tratamiento de la infección (Buller, 2004).

1.1.7 Aislamiento y cultivo de MNT

Entre el 10% y el 30% de las micobacterias identificadas en entornos clínicos no se clasifican dentro del complejo *M. tuberculosis* (Gauthier & Rhodes, 2009). Aspectos como la morfología, pigmentación, temperatura óptima de desarrollo y velocidad de crecimiento son elementos cruciales para la caracterización de cepas micobacterianas. Para cultivar eficientemente mycobacterium, se emplean diversos medios selectivos, un ejemplo de esto es la micobactina, que mejora el crecimiento de micobacterias de desarrollo lento en medios estándar, mientras que los medios no selectivos son ineficaces para micobacterias de desarrollo lento, resultan ideales para aquellas de crecimiento rápido (Hashish et al., 2018).

Entre los medios recomendados se encuentran los de huevo Petragani, Lowenstein-Jensen, Middlebrook 7H10 y Dorset. Es aconsejable incubar los cultivos durante 2 a 30 días a una temperatura de 20 a 30 °C para permitir la observación del crecimiento inicial. Este proceso puede resultar complicado debido a la rigurosidad del patógeno y la posibilidad de contaminación. *M. fortuitum* y *M. chelonae* son clasificados como de crecimiento rápido, con un crecimiento visible en aproximadamente 7 días, a diferencia

de *M. marinum*, que puede no ser detectable hasta después de 30 días (Rhodes et al., 2004).

La descontaminación de muestras para el cultivo en medio sólido Lowenstein-Jensen y Stonebrink a 37 °C hasta 60 días ha demostrado ser la mejor estrategia para la detección de micobacterias de tejido (Francis-Floyd, 2011). El método Petroff, que utiliza NaOH al 4% seguido de neutralización con HCl 1N, se emplea tradicionalmente en muestras de tejido refrigeradas o congeladas. Alternativamente, se puede sumergir los fragmentos en una solución saturada de borato de sodio para conservarlos hasta por dos meses sin refrigeración o congelación, siendo adecuado para condiciones de campo (Hattem et al., 2021). Además, el HPC al 0,75% y el Ácido Sulfúrico al 6% han demostrado baja toxicidad, con el HPC prescindiendo de la etapa de neutralización y ofreciendo un procesamiento más rápido. El NaOH (2%) también se utiliza en algunos centros de control de enfermedades para la descontaminación (Beran et al., 2006).

El NaOH y el HPC descomponen las paredes celulares de las micobacterias, mientras que el HCl crea un entorno ácido que contribuye a la destrucción de bacterias y hongos no resistentes a ácidos, minimizando así el crecimiento de microorganismos competidores (Hattem et al., 2021; Lorencova et al., 2013). Estas soluciones descontaminantes se eligen por sus propiedades químicas, que reducen la carga bacteriana de otros microorganismos de crecimiento rápido y elevan el pH de la muestra a niveles propicios para el desarrollo de MNT. Sin embargo, la calidad de los aislamientos de micobacterias puede variar según la solución utilizada o su combinación (Lorencova et al., 2013; Shukla et al., 2013).

1.2 Planteamiento del problema

La micobacteriosis, es una enfermedad crónica que afecta comúnmente a especies acuáticas de agua dulce y salina, misma que se ha convertido en una amenaza significativa para la producción acuícola (Colín García, 2019). Específicamente, la presencia de esta enfermedad en las tilapias no solo limita su producción debido a la aparición de enfermedades anteriormente mencionadas, sino que también tiene un impacto directo en la economía local del Ecuador, donde esta especie en cultivo desempeña un papel importante en el sustento económico de las familias (Jácome

et al., 2019). Las infecciones por el género *Mycobacterium* en esta especie representan un riesgo para la estabilidad económica local.

Adicionalmente estas infecciones representan un peligro para la población, específicamente para los trabajadores de la industria pesquera y a personas expuestas a entornos acuáticos, debido a que las micobacterias que infectan a los peces también pueden ser patógenos zoonóticos capaces de causar infecciones tanto localizadas como diseminadas en los humanos. La infección generalmente se produce por contacto directo a través de heridas expuestas a peces infectados o durante la manipulación de peceras, como en las tareas de limpieza o el cambio de agua (Orjuela Leguizamón et al., 2021).

El diagnóstico de la micobacteriosis presenta complicaciones debido a las características intracelulares que tiene el género *Mycobacterium*, mencionado anteriormente, así mismo, estas características incluyen el crecimiento lento de ciertas especies, lo que dificulta su cultivo en medios específicos. El lento crecimiento de las micobacterias resulta desafiante, debido a que puede originar una competencia con otros microorganismos presentes en las muestras, los cuales pueden colonizar y dominar el medio de cultivo, dificultando la detección y el aislamiento de las micobacterias (Dorronsoro & Torroba, 2007).

1.3 Justificación de la investigación

Las micobacterias no tuberculosas son difíciles de aislar mediante técnicas microbiológicas convencionales, generando la necesidad de emplear tratamientos complejos para un aislamiento exitoso (Dorronsoro & Torroba, 2007; Jankute et al., 2015). A pesar de ello, ciertos tratamientos afectan la recuperación de este microorganismo, es por ello que es necesario optimizar metodologías de pre-tratamiento y cultivo para el aislamiento de micobacterias no tuberculosas (MNT). Se empleará HPC, NaOH y HCl, así como probar el crecimiento de las muestras de macerados de órganos de tilapias en medios de cultivo Lowenstein Jensen y TSB con antibióticos con el fin de inhibir el crecimiento de microorganismos no deseados.

1.4 Objetivos de la investigación

1.4.1 General

Evaluar la eficacia de dos metodologías de aislamiento para maximizar la detección de micobacterias no tuberculosas en muestras de órganos de tilapia.

1.4.2 Específicos

- Comparar dos metodologías de descontaminación para maximizar los aislamientos de micobacterias no tuberculosas MNT.
- Evaluar la eficiencia del crecimiento de aislados de MNT en dos medios de cultivo distintos: Lowenstein Jensen (LJ) y Caldo Soja tripticaseína (TSB) con antibióticos.
- Determinar y comparar la prevalencia de MNT en órganos específicos, como branquias, y órganos internos (riñón, bazo e hígado) para identificar en cuál de ellos se presenta una mayor presencia de crecimiento bacteriano.
- Utilizar técnicas moleculares para identificar las especies de MNT presentes en las muestras.

CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1 Medio de cultivo TSB con antibiótico (Medio A)

A un frasco autoclavable se añadió 30 g de TSB y 15 g de agar. Luego, se añadió 10 ml de glicerol y se aforó con agua destilada hasta obtener un volumen de 1000 ml, se homogeneizó mediante agitación y calor, hasta lograr la completa dilución. El medio de cultivo fue autoclavado durante 45 minutos. Posteriormente, en cabina de bioseguridad, se agregó los antibióticos uno seguido del otro: 1 ml de vancomicina (10 mg/l), 1 ml ácido nalidíxico (25 mg/ml) y 1 ml de anfotericina (5 mg/l). Finalmente, se homogeneizó el medio y se distribuyó en placas petri.

2.2 Medio de cultivo Lowenstein-Jensen (Medio B)

En 375 ml de agua estéril autoclavada se añadió 23,3 g de medio L-J, 7,5 ml de glicerol al 1% y 0,13 g de verde malaquita, se colocó en el microondas durante 1-2 minutos, agitándolo cada 20 segundos hasta que el medio se disolviera por completo. Se ajustó el pH a 6.6 mediante la adición de NaOH, seguido se autoclavó el medio a 121°C durante 45 minutos. Posteriormente, 625 ml de huevos enteros fueron licuados, filtrados y se agregó al medio para que solidificara y proporcionara nutrientes a las micobacterias. El medio L-J se dispensó en tubos de ensayo y se solidificaron en baño maría a 85 °C durante 60 minutos. Luego se incubó los tubos a 37 °C por 48 horas. Finalmente, se almacenaron los tubos en el refrigerador.

2.3 Procesamiento de muestra y obtención de órganos

En tres diferentes puntos de crianza de pesca del cantón Tena, se adquirió 68 tilapias destinadas al experimento que se evaluó en 12 tandas. Adicionalmente, se adquirió 12 tilapias como grupo de control. Las tilapias fueron transportadas en un cooler con hielo y luego fueron sometidas a refrigeración a una temperatura de -30 durante 35 minutos, provocando su muerte. Posteriormente, con la ayuda del bisturí, se realizó una incisión en la línea media ventral de la tilapia para extraer de manera aséptica muestras de riñones, bazo, hígado y branquias (López, 2008). Posteriormente, se colocó aproximadamente 0.10 g de cada órgano extraído en tubos Eppendorf de 1.5 ml, los cuales contenían 150 uL de PBS 1X. Los órganos internos fueron macerados y

procesaron en conjunto, a diferencia de las branquias, que fueron procesadas de forma individual. Para los controles positivos se inoculó una cepa de MNT, controles que fueron sometidos para ambos métodos.

2.3.1 Diseño Experimental

Se procesó 68 tilapias, generó 68 tubos Eppendorf con macerados de órganos internos (hígado, bazo y riñón) y otros 68 tubos Eppendorf con macerados de muestras de branquias. Ambos grupos fueron sometidos a ambos métodos de descontaminación. Las 136 muestras descontaminadas de órganos internos y branquias se incubaron en dos medios de cultivo distintos, LJ y TSB, generando un total de 544 observaciones. Número de observación sin contar el grupo control. Para una comprensión más detallada del diseño experimental, consulte el esquema en el **Anexo 1**.

2.3.2 Grupo Control

En cada ensayo experimental se empleó una tilapia como control, en la cual se aplicó el mismo procedimiento de obtención de muestra y maceración de órganos. A las muestras maceradas se inoculó una MNT previamente aislada e identificada a partir de una muestra de pez. Esto se llevó a cabo para evaluar que los métodos de descontaminación no sean agresivos para la obtención de MNT.

2.4 Descontaminación con HPC y NaOH (Método 1)

En los mismos tubos donde se había colocado la muestra de órganos, se homogeneizó la muestra evitando derrames. Se añadió 700 µL adicionales de PBS 1X, y se dejó reposar durante 30 minutos para permitir la sedimentación. Una vez transcurrido este tiempo, se tomó 400 µL del líquido sobrenadante y se colocó en tubos Eppendorf, donde se mezcló con HPC al 1% y se descontaminó durante 20 minutos, realizando una agitación mediante vortex cada 3 minutos. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 4500 rpm durante 15 minutos, y se descartó el sobrenadante. El pellet resultante se lavó con 800 µL de agua destilada estéril, se mezcló mediante vortex y se centrifugó a 4500 rpm durante 10 minutos, descartando nuevamente el sobrenadante. Este proceso de lavado se repitió dos veces más (Ambrosio et al., 2008).

El pellet obtenido se resuspendió y homogeneizó con 90 µL de agua destilada estéril. A esta suspensión se añadieron 90 µL de NaOH al 4%, se mezcló en vortex durante 2 minutos y se centrifugó a 4500 rpm durante 5 minutos, eliminando el sobrenadante. Luego, se volvió a resuspender con 90 µL de agua destilada estéril, se homogeneizó con vortex y se centrifugó a 4500 rpm durante 5 minutos, descartando el sobrenadante. Estos dos pasos se repitieron una vez más. Posteriormente, el pellet se resuspendió con 100 µL de agua destilada estéril, se mezcló y se inocularon 50 µL en tubos con medio L-J y 50 µL en placas con medio TSB con antibióticos (Calderón, 1982).

2.5 Descontaminación con NaOH y HCl (Método 2)

En los mismos tubos donde se había colocado la muestra de órganos, se homogeneizó la muestra evitando derrames. Se añadieron 700 µL adicionales de PBS 1X, y se dejó reposar durante 30 minutos para permitir la sedimentación. Luego, se tomó 800 ml del sobrenadante de la muestra homogeneizada, el cual se depositó en tubos Eppendorf de 1,5 ml. Estos tubos fueron sometidos a centrifugación a 4500 rpm durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante y el sedimento resultante se resuspendió en 700 ml de NaOH al 4% (Hattem et al., 2021).

Después de exponer la muestra al NaOH durante 2 minutos, se neutralizó agregando 150 µL de HCl al 1%. Los tubos fueron nuevamente centrifugados a 4500 rpm durante 10 minutos, descartando nuevamente el sobrenadante. Los sedimentos resultantes se resuspendieron en 500 µL de agua destilada y se homogeneizó mediante vórtex. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 4500 rpm durante 5 minutos, este último lavado se repitió una vez más. El sedimento se resuspendió en 100 µL de agua destilada y se homogeneizó con una micropipeta. Finalmente, se inocularon 50 µL de cada tratamiento en tubos que contenían medio Lowenstein-Jensen y en placas con medio TSB con antibióticos.

2.6 Descripción fenotípica y análisis de coloración

A las colonias de micobacterias se realizó una descripción detallada de las características macroscópicas, donde se observó y analizó aspectos como pigmentación, rugosidad y forma de las mismas.

Para confirmar la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes en los cultivos de micobacterias, se utilizó la técnica de Ziehl-Neelsen. Se empleó reactivos específicos, como fucsina fenicada, alcohol ácido, y el azul de metileno como colorante de contraste. Para su preparación se utilizó 50 ml de fucsina fenicada, se disolvió 0,74 g de fucsina básica en una mezcla de 5 ml de fenol y 5 ml de etanol absoluto, aforando con agua tipo 2 autoclavada hasta alcanzar un volumen de 50 ml. Por otro lado, el alcohol-ácido 3%, se preparó mezclando 1,5 mL de HCl concentrado con 48,5 ml de etanol absoluto. Además, se preparó una solución de azul de metileno al 1% disolviendo 0,1 g de azul de metileno en 100 ml de agua destilada (Arteta et al., 2022).

Una vez preparadas las soluciones, se realizó un frotis de cultivo bacteriano de micobacterias, fijando el frotis mediante aplicación de calor. A continuación, se cubrió completamente la muestra seca con fucsina-fenicada, permitiendo que el colorante actuara por 5 minutos. Durante este tiempo, se aplicó calor al portaobjetos utilizando un mechero, evitando que el colorante llegara a hervir o se secara. Transcurridos los 5 minutos, se llevó a cabo un lavado indirecto de la placa utilizando agua destilada eliminando todo el colorante. Luego, se aplicó alcohol-ácido 3% al portaobjetos durante 2 minutos, seguido de otro lavado indirecto con agua destilada. A continuación, se cubrió el portaobjetos con azul de metileno al 1% durante 3 minutos y se lavó con agua destilada. Se inclinó el portaobjetos hasta que drenara el exceso de agua y se dejó que se secara al aire. Finalmente, se observó la placa bajo el microscopio, comenzando con el objetivo 4x, enfocando y cambiando de objetivo hasta 100X (Rojas Jaimes et al., 2018).

2.7 Extracción de ADN

Una vez se confirmó la presencia de bacilos ácido-alcohol resistente, se procedió a hacer axénicos en medios de cultivo TSB. Para la extracción de ADN, en una cabina de bioseguridad se agregó 500 µL de Buffer TE 1X a un tubo de 1.5 ml. Se transfirió una porción considerable de colonias positivas para MNT al tubo y se mezcló con vortex para asegurar una distribución homogénea. Posteriormente, la suspensión se colocó en un termobloque a 100 °C durante 8 minutos. Finalmente, se transfirió 300 uL del sobrenadante a un tubo estéril y se almacenó a -20 °C (Koentjoro et al., 2021;Ledesma et al., 2022).

2.8 PCR de muestras de ADN de micobacterias atípicas y electroforesis

El ADN extraído se descongeló a temperatura ambiente, se procedió a hacer ensayos de PCR. En 25 μ l se hizo reaccionar: 5 μ l [1x] buffer, 2 μ l [2 mM] MgCl₂, 5 μ l [2 mM] dNTP's, 2 μ l [0.8 μ M] primer forward 16S A1F (5'-ctggctcaggacgaacgctg-3'), 2 μ l [0.8 μ M] primer reverse 16S 54R (5'-tctagtctgccgtatcgccc-3'), 0.25 μ l [1.25 U/ μ l] Taq polimerasa, 3,75 μ l H₂O, 5 μ l ADN [46]. Las temperaturas y tiempos de cada etapa de la PCR se muestran en la **Tabla 1**. Finalmente, los amplicones resultado de la PCR se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Tabla 1. Condiciones de PCR para el gen 16S.

Pasos	Temperatura	Tiempo	35 ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	5 min	
Desnaturalización	96 °C	30 s	
Hibridación (Annealing)	63 °C	30 s	
Extensión	72 °C	30 s	
Extensión final	72 °C	10 min	
Conservación	4 °C	∞	

Realizado por: Hernandez, Moises, 1999

2.9 Secuenciación y análisis en el software Mega

Especies fueron identificadas por secuenciación del gen 16S rRNA. Los amplicones de PCR se secuenciaron en La Universidad de Las Américas (UDLA) donde se incluyó una corrida electroforética capilar de cada muestra en una mezcla realizada con Hi-Di formamida y marcador interno de tamaño molecular que incluyó estándares hasta 600 pb (Liz GS600 de Applied Biosystems). Según el algoritmo de estimación de tamaño incluido en el software Genemapper V3.1, se pudo determinar con exactitud (+1pb) tamaños menores a 580 pb. Los fluorocromos del kit DS-33 (G5) incluyeron 6FAM, VIC, NED, PET. La limpieza de las secuencias resultantes es decir la eliminación de bases de baja calidad se la realizó mediante el software bioinformático MEGA11, una vez limpiadas las secuencias estas se convirtieron a formato FASTA. Finalmente, con la herramienta bioinformática BLAST se encontró regiones de similitud entre secuencias para la identificación de especies de MNT.

2.10 Análisis estadístico

2.10.1 Test de independencia Chi cuadrado

Se designó la presencia o ausencia de micobacterias como variable dependiente, mientras que método, medio y órgano como variables independientes. Se planteó las siguientes hipótesis; (H0): El crecimiento de MNT no dependerá del método, medio u órgano empleados; (H1): El crecimiento de MNT dependerá del método, medio u órgano empleados. Test realizado en Python utilizando los paquetes pandas, cipy.stats, statsmodels.stats.multitest, seaborn y matplotlib.pyplot.

Se optó por utilizar esta prueba para analizar la relación entre las variables categóricas mencionadas previamente y la presencia o ausencia de MNT. Esta elección se fundamenta en la naturaleza de nuestros datos, los cuales no corresponden a variables numéricas continuas. **Ver Anexo 2.**

2.10.2 Estadístico Z para la proporción de muestra

En la evaluación comparativa, se consideraron tres categorías, cada una representando la presencia de (MNT) en distintos contextos. Estas categorías incluyen la comparación de la presencia de MNT entre el método 1 y el método 2, la presencia de MNT entre los medios de cultivo LJ y TSB, así como la presencia de MNT en órganos internos y branquias. Además, como otra categoría se evaluó la contaminación que se presentó en los métodos 1 y 2. Prueba realizada en Python utilizando los paquetes numpy y statsmodels.stats.proportion.

CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

3.1 Análisis de dependencia entre variables categóricas e incidencia de micobacterias no tuberculosas (MNT) utilizando chi-cuadrado

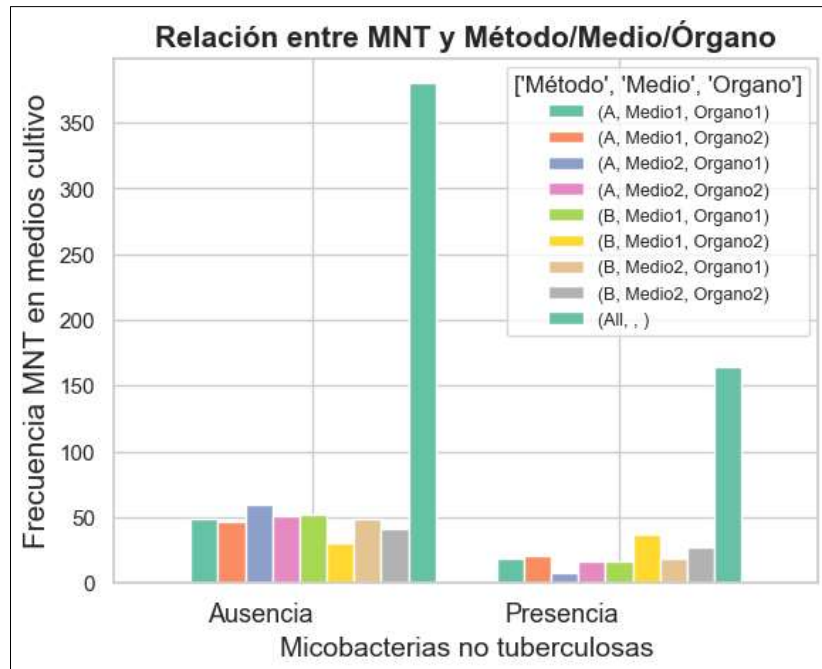


Figura 1. Relación entre la variable dependiente (Micobacterias no tuberculosas) y las variables independientes (método, medio, órgano). El eje x representa la ausencia o presencia de micobacterias. La designación A corresponde al método 1, mientras que B se refiere al método 2. En cuanto a los medios Medio 1 representa LJ y Medio 2 representa TSB. Órgano 1 se refiere a órganos internos (hígado, riñón, bazo), mientras que órgano 2 hace referencia a branquias.

Realizado por: Sarai Gaibor y Lenin Vásquez, 2024

En la prueba de Chi cuadrada realizada, se obtuvo un $p = 0,003$. Dado que este valor es menor que el nivel de significancia (0.05), se rechaza la hipótesis nula, lo que sugiere que existe evidencia suficiente para respaldar una relación significativa entre la presencia de micobacterias no tuberculosas y las variables analizadas, como método, medio y órgano utilizados.

3.2 Comparación de las observaciones que muestran presencia de micobacterias no tuberculosas (MNT) en relación con las variables independientes

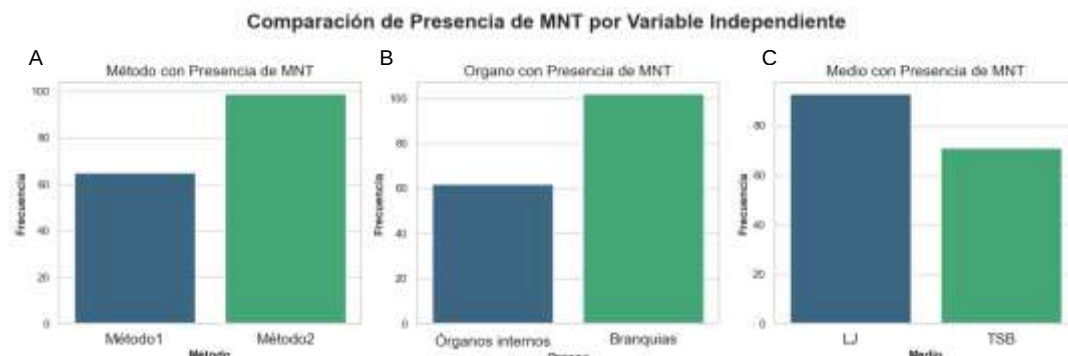


Figura 2. Comparación de la presencia de micobacterias en relación con el método utilizado, órgano y medio de cultivo.

Realizado por: Sarai Gaibor y Lenin Vásquez, 2024

El análisis de 544 observaciones, sin contar con aquellas realizadas como controles positivos, que comprende los métodos M1 y M2, así como los medios de cultivo LJ y TSB+A, reveló que el 73.52% de los peces examinados resultaron positivos para MNT. Se registró 65 observaciones positivas (23.90%) para M1 y 99 observaciones positivas (36.40%) para M2. Respecto a los medios de cultivo, LJ presentó 93 observaciones positivas (17.10%), mientras que TSB mostró 71 observaciones positivas (13.05%). Además, se registró 62 observaciones positivas (11.40%) en órganos internos y 102 observaciones positivas (18.75%) en branquias. **Ver Figura 2.** La contaminación que se presentó para el M1 fue de 5.15 % mientras que en el M2 de 6.25%.

3.3 Estadístico Z para la proporción de una muestra

Los resultados muestran la proporción entre M1 y M2; contaminación M1 y M2; órganos internos y branquias, demuestra que los valores negativos del estadístico Z en cada caso indican diferencias entre las proporciones de cada grupo, siendo estadísticamente significativas. Esto quiere decir que la presencia de micobacterias en M1 y en órganos internos es significativamente menor que en M2 y en branquias, respectivamente. En cuanto a la contaminación, esta es significativamente menor en M1 en comparación con M2. Por otro lado, el valor positivo del estadístico Z indica que la proporción en el medio de cultivo LJ es mayor que en TSB+antibiótico. Sin embargo, el $p = 0.05$ está cerca del umbral de 0.05, por lo que, aunque hay una tendencia, la diferencia no alcanza significancia estadística.

Tabla 2. Estadística Z proporcional con p-valor para la comparación entre métodos, contaminación, medios y órganos.

	M1 y M2	Contaminación M1 y M2	Medio LJ y TSB	Órganos internos y Branquias
Estadístico Z	-3.176615455	-2.597956823	1.953788797	-3.389350866
p-valor	1.4900×10^{-3}	9.3780×10^{-3}	5.0726×10^{-2}	7.0058×10^{-3}

Comparación entre el método 1 y método 2; contaminación entre método 1 y método 2; medio LJ y TSB; órganos internos y branquias.

Realizado por: Gaibor Sarai y Vásquez Lenin, 2024

3.4 Análisis fenotípico de Tilapias del nilo: individuos sanos y enfermos

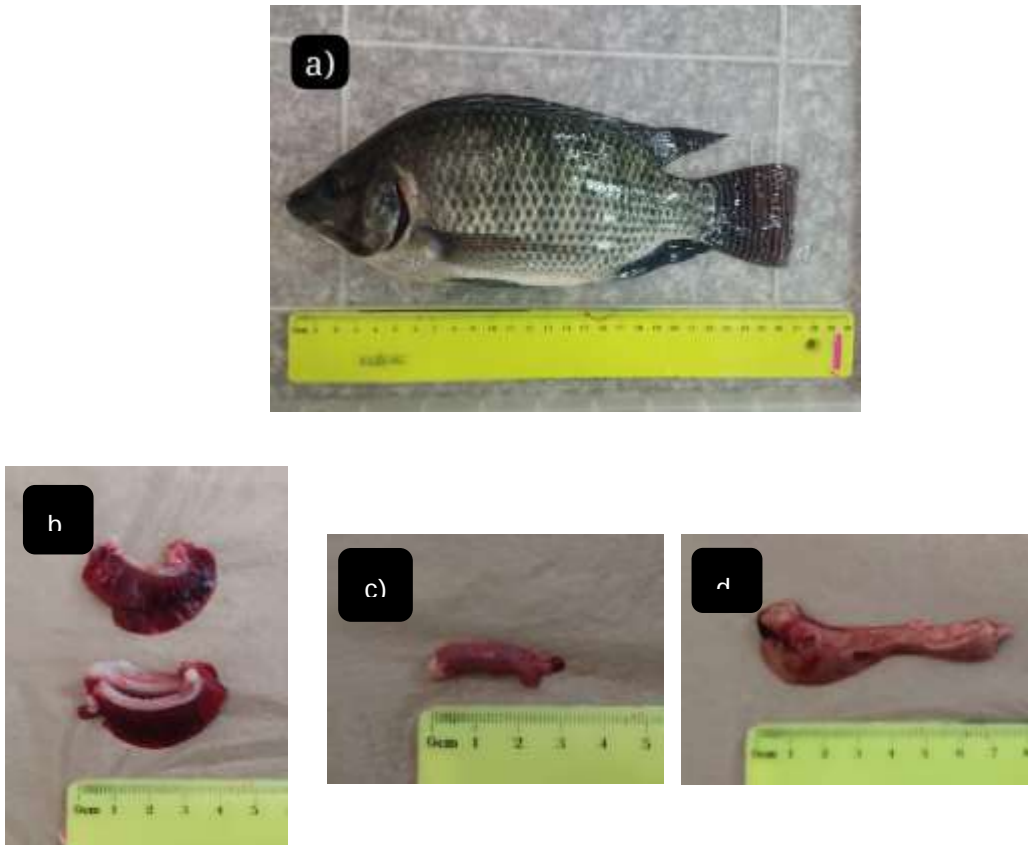


Figura 3. Tilapia número 63, individuo sano. A) Tamaño aproximado de 23 cm. B) Branquias. C) bazo. D) Hígado.

Fotografía tomada por: Sarai Gaibor y Lenin Vásquez, 2024

La tilapia número 63 de 23 cm de longitud se distingue por ojos sin abultamiento y escamas intactas que cubren completamente su cuerpo, con aletas claramente definidas. Los órganos externos e internos (branquias, bazo e hígado) muestran una coloración uniforme y longitud de 4 cm, 3 cm y 7.5 cm respectivamente: las branquias presentan un tono rojo claro de aproximadamente 4 cm, el bazo exhibe un matiz rojizo

oscuro con un tamaño de 2.5 cm, el hígado presenta un tono marrón rojizo claro con un tamaño aproximado de 8 cm, y el riñón muestra un tono rojizo con un tamaño de aproximadamente 10 cm.

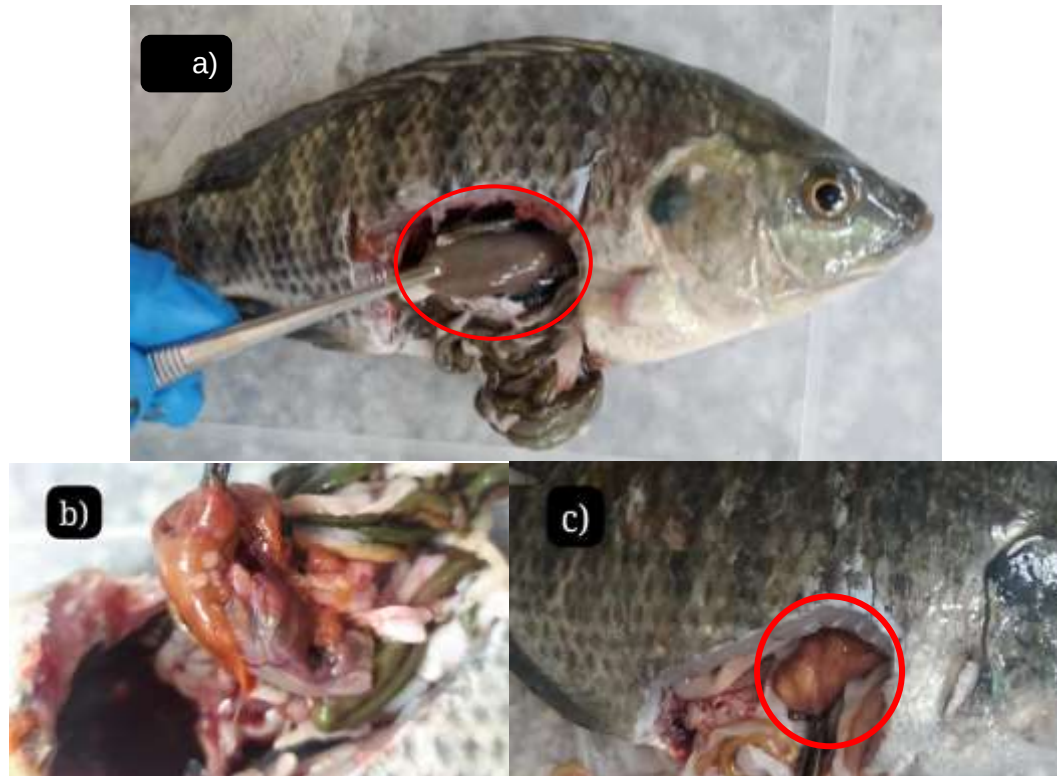


Figura 4. Tilapias enfermas. A) Tilapia número 27 con patología en bazo. B) Tilapia número 29 con patología en hígado. C) Tilapia número 25 con patología en bazo.
Fotografía tomada por: Sarai Gaibor y Lenin Vásquez, 2024

Las tilapias enfermas se identificaban por mostrar un contorno abdominal abultado y blando, además de presentar mucosidad en las agallas y patologías en los órganos. En el caso específico de la Tilapia 27, se observó que el bazo presentaba un tono opaco de color café/plomo. La Tilapia 29, se observó granulomas blancos en el hígado, el cual exhibía un tono amarillento y se deshacía fácilmente. Por otro lado, la Tilapia 25 mostraba una especie de masa color amarillo dentro del bazo, este órgano estuvo caracterizado por un tono rojo opaco.

3.5 Análisis fenotípico de MNT presente en muestras procesadas

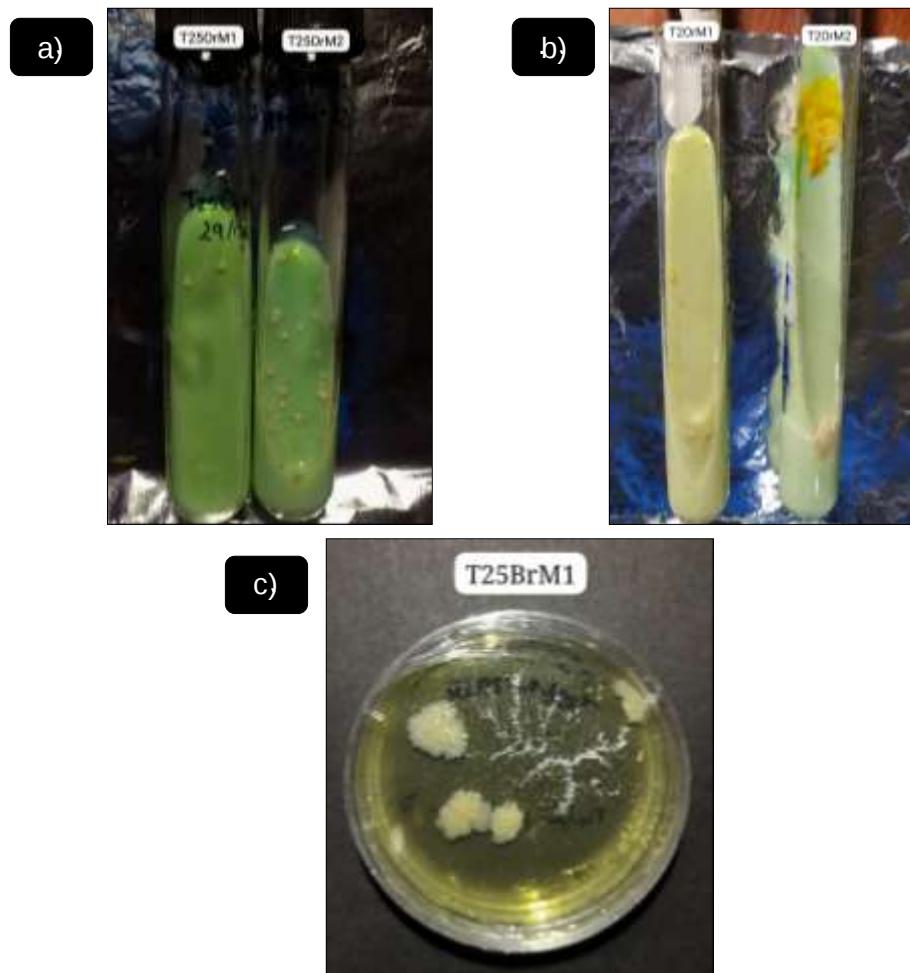


Figura 5. Presencia de colonias en muestras procesadas, procedentes de órganos internos y branquias.
Fotografía tomada por: Sarai Gaibor y Lenin Vásquez, 2024

Las muestras procesadas que exhiben presencia de colonias se distinguían por presentar características comunes: una forma circular, superficie lisa y coloración blanca/crema. Además, se identificó la presencia de estos microorganismos con una tonalidad amarillenta y superficie lisa, mientras que otro grupo mostraba una textura rugosa y coloración crema, tal como se aprecia en la figura 5 a), b), y c), respectivamente.

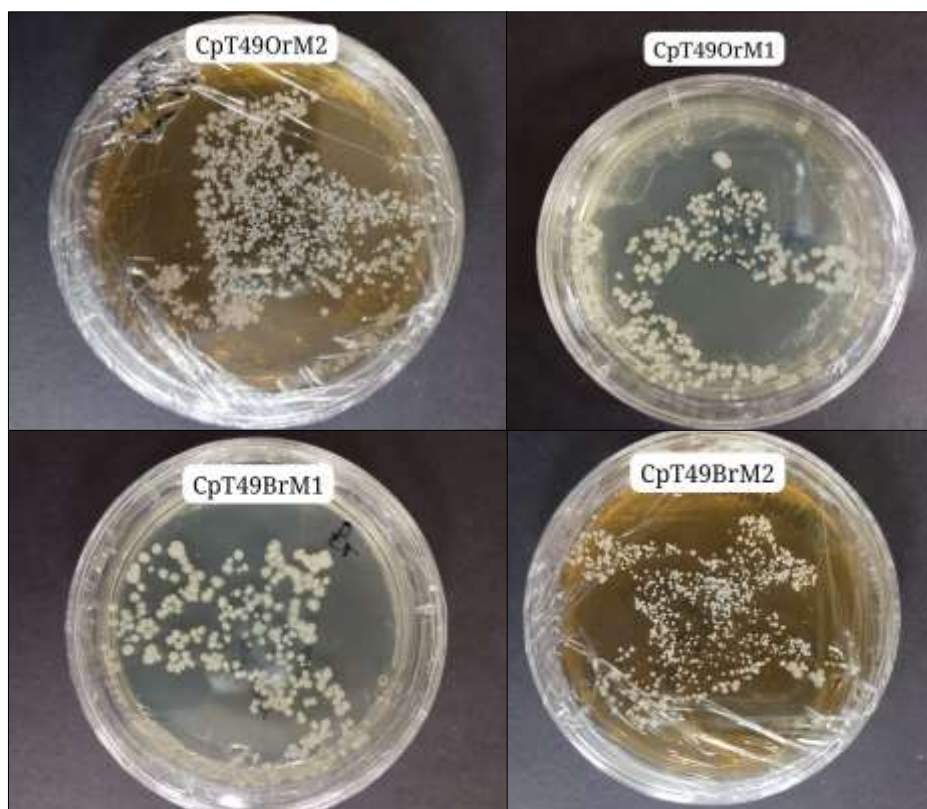


Figura 6. Muestras procesadas utilizadas como control positivo. Evidenciando la presencia de Micobacterias No Tuberculosos (MNT) en ambos métodos.

Fotografía tomada por: Sarai Gaibor y Lenin Vásquez, 2024

3.6 Análisis genotípico de MNT presente en muestras procesadas

La tabla presenta las especies identificadas en los peces analizados, donde las características de cada especie se denotan mediante códigos: b para blanca, c para crema, a para amarilla; l para lisa, y r para rugosa. Entre las especies encontradas se incluyen *M. fortuitum*, *M. paragordoniae*, *M. cosmeticum*, *M. abscessus*, *M. porcinum* y *M. sp.*

Tabla 3. Especie de micobacterias no tuberculosas obtenidas y sus características de crecimiento.

CÓDIGO (#tilapia, órgano, método)	Medio de cultivo	Especie de MNT Obtenidas	Características	Tiempo de incubación (días)
20II.1	LJ	<i>M. paragordoniae</i>	bl	31
20I	LJ	<i>M. fortuitum</i>	br	28
20I.2	LJ	<i>M. cosmeticum</i>	cl	40
10BII.1	TSB	<i>M. fortuitum</i>	cl	14
11BII.2	LJ	<i>M.sp</i>	al	35
12BII	LJ	<i>M. fortuitum</i>	cr	16
23BI.2	LJ	<i>M.sp</i>	br	12
23BII.1	TSB	<i>M. fortuitum</i>	bl	20
25OI.1	TSB	<i>M. fortuitum</i>	bl	12
25OI.2	LJ	<i>M. fortuitum</i>	br	11
25OII.1	LJ	<i>M. fortuitum</i>	br	13
25OII.2	LJ	<i>M.sp</i>	bl	13
25BI	LJ	<i>M. sp</i>	br	12
26OII	LJ	<i>M.sp</i>	br	13
26BII	TSB	<i>M. fortuitum</i>	cr	15
27OII	TSB	<i>M. fortuitum</i>	cr	11
27OII.1	LJ	<i>M.sp</i>	bl	11
27OII.2	TSB	<i>M.sp</i>	bl	14
27BI.1	TSB	<i>M.sp</i>	br	17
27BII.1	TSB	<i>M. fortuitum</i>	br	20
28OI	TSB	<i>M. porcinum</i>	cl	33
28OI.2	TSB	<i>M.sp</i>	cl	34
28BII	LJ	<i>M.sp</i>	cl	30
28OII.3	TSB	<i>M. abscessus</i>	cr	25
29BII.1	LJ	<i>M. fortuitum</i>	cr	10
29BII.2	TSB	<i>M. fortuitum</i>	cr	17
30BI.1	LJ	<i>M. porcinum</i>	cl	10
33BII	LJ	<i>M. fortuitum</i>	cl	13
36BII.1	TSB	<i>M. fortuitum</i>	cr	11
38BII.2	LJ	<i>M.sp</i>	cl	14

39OII.3	LJ	<i>M.fortuitum</i>	cr	17
40OII.2	TSB	<i>M.fortuitum</i>	cr	7
41BII.1	LJ	<i>M.fortuitum</i>	cr	9
49OII.1	TSB	<i>M.sp</i>	cl	15

Realizado por: Sarai Gaibor y Lenin Vásquez, 2024

3.7 Identificación celular microscópico de las Micobacterias no tuberculosas por Ziehl Neelsen

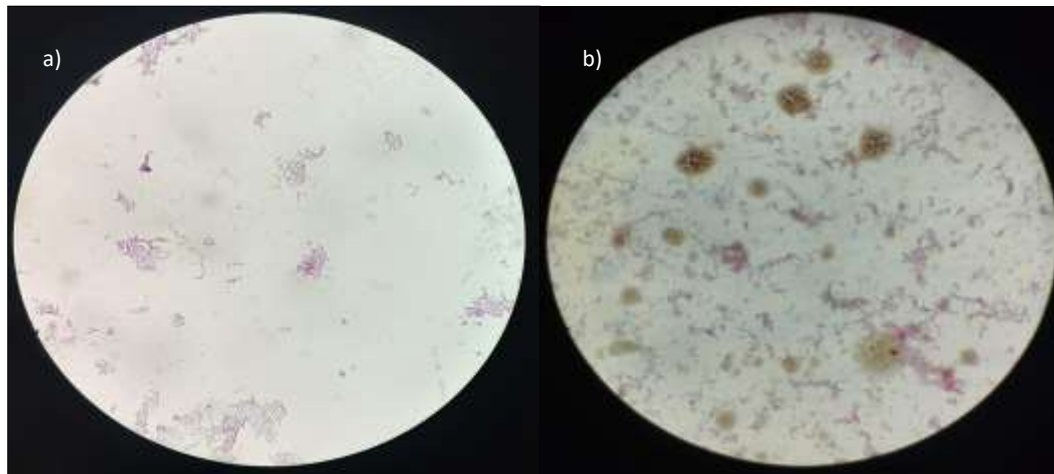


Figura 7. Tinción Ziehl Neelsen de *M. sp* y *M. fortuitum*, se observa agrupaciones a 40X.
Fotografía tomada por: Sarai Gaibor y Lenin Vásquez, 2024



Figura 8. Tinción Ziehl Neelsen de *M. abscessus*, se observa bacilos unicelulares a 40X.
Fotografía tomada por: Sarai Gaibor y Lenin Vásquez, 2024

CAPÍTULO VI: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

4.1 Optimización de métodos de descontaminación: Análisis entre método 1 (HPC 1% + NaOH 4%) y método 2 (NaOH 4% + HCl 1%)

La prueba Chi-cuadrada, detallada en la **Figura 1**, demostró que la presencia de micobacterias no tuberculosas va a depender de varios factores, como la metodología empleada, el medio de cultivo utilizado y el órgano analizado. Para distinguir específicamente cuál método descontaminante o medio de cultivo fue más efectivo, se llevó a cabo la prueba Z proporcional.

El análisis comparativo entre el Método 1 y el Método 2 para la recuperación de MNT, detallado en la **Figura 2, inciso A**. Revela que la tasa de recuperación alcanzada mediante el Método 2 (36.40%), utilizando NaOH 4% + HCl 1%, superó a la del Método 1 (23.90%), el cual emplea HPC 1% + NaOH 4%. Esta diferencia demostró ser estadísticamente significativa, ya que el p-valor obtenido en la prueba Z de proporciones fue inferior a 0.05, según se indica en la **Tabla 2**.

Un entorno favorable para el crecimiento del género *Mycobacterium* requiere un pH entre 6 a 7.5 (Rao et al., 2001). En ambos métodos, se utilizó NaOH 4 % como descontaminantes. Dada a su propiedad alcalina, este agente tiene la capacidad de modificar el pH del entorno, facilitando la degradación de contaminantes y microorganismos competidores. Sin embargo, este ambiente modificado por NaOH puede interferir en las funciones celulares de las micobacterias, debilitándolas y haciéndolas más susceptibles a la descontaminación, estudios han demostrado que las MNT son sensibles al NaOH (Hammer-Dedet et al., 2021; Whitten et al., 1992). En el método 2, la adición de HCl al 1%, un ácido fuerte, al combinarse con NaOH, provoca una neutralización mutua. Este proceso detiene la acción alcalina sobre los microorganismos (Whitten et al., 1992).

La contaminación que se presentó en el método 1 fue inferior (5.15 %), en comparación del método 2 (6.25%). Esta diferencia demostró su significancia estadística, ya que el p-valor obtenido en la prueba Z de proporciones fue menor a 0.05, como se detalla en **Tabla 2**. La menor incidencia de microorganismos no deseado que presentó el método 1, es debido al empleo de hexadecilpiridinio cloruro (HPC), compuesto con propiedades bactericida y fungicidas atribuyendo de manera eficaz la desinfección del entorno (Ambrosio et al., 2008).

4.2 Análisis entre medios de cultivo Lowenstein-Jensen (LJ) y TSB + antibiótico

El análisis comparativo entre el método 1 y el método 2 para la recuperación de MNT, detallado en la **Figura 2, inciso C**. Revela que la tasa de recuperación alcanzada con el uso del medio LJ (17,10 %), superó al medio TSB+antibiótico (13.05 %). Esta diferencia demostró que no es estadísticamente significativa, ya que el p-valor obtenido en la prueba Z de proporciones no es menor que 0.05 **Tabla 2**. Los medios de cultivo juegan un papel crucial en el aislamiento y la identificación de micobacterias, y la elección entre ellos depende de diversos factores. Los medios a base de huevos, como el LJ, han demostrado ser eficaces en el cultivo de MNT (Hattem et al., 2021). La característica selectiva de estos medios contribuye a un ambiente propicio para el crecimiento de micobacterias, permitiendo su recuperación con una tasa de éxito destacada (Hashish et al., 2018).

Es importante destacar que, a pesar de la falta de significancia estadística en la diferencia de tasas de recuperación entre LJ y TSB+antibiótico, el medio LJ ha demostrado ser una opción valiosa en comparación con otros medios líquidos utilizados en el cultivo de micobacterias (Shukla et al., 2013). En la literatura, se menciona que algunos medios líquidos, como el MB-Redox, han logrado mejoras sustanciales en términos de tiempo de detección y tasa de recuperación (Hattem et al., 2021; Slany et al., 2014).

Además, es relevante señalar la escasez de estudios específicos sobre el aislamiento de MNT utilizando el medio TSB. Aunque ocasionalmente se pueden aislar micobacterias en medios bacteriológicos de uso general, como el agar de soya tripticaseína siempre y cuando la cantidad de muestra a inocular sea grande (Tesemma et al., 2019). Los resultados obtenidos en esta investigación respaldan la eficacia del

medio LJ en el aislamiento de MNT en muestras de macerados de órganos de tilapia, destacando su importancia en el diagnóstico y la investigación.

4.3 Análisis de la presencia de micobacterias no tuberculosas (MNT) en órganos internos (bazo, riñón e hígado) y branquias

La representación gráfica en el inciso B de la **Figura 2** que detalla la recuperación de micobacterias no tuberculosas revela una presencia más elevada en las branquias (18.75%) en comparación con los órganos internos (11.40%). Las micobacterias no tuberculosas son comunes en entornos acuáticos naturales o entornos creados artificialmente por el ser humano, como estanques (Buitrago Portillo & Ramírez Herrera, 2006). Las branquias, al ser un órgano que interactúa directamente con el medio acuático, facilitan la recuperación de MNT. Sin embargo, la persistencia de esta infección dependerá de las condiciones en las que se encuentre el pez, lo que podría resultar la presencia de micobacterias en órganos internos, como se presenta en la **Figura 4**. Estanques con agua a concentraciones elevadas de materia orgánica (heces fecales, restos de alimentos y animales enfermos), baja concentración de oxígeno y una alta densidad de peces, son condiciones que debilitan el sistema inmunológico del pez, aumentando la susceptibilidad a esta infección (Bhavsar et al., 2016). En contraste, un estudio evidenció que la suspensión de la alimentación con despojos de pescado no pasteurizados logra reducir significativamente los casos de micobacteriosis en criaderos de salmón. En este contexto, se sugiere la despoblación de reproductores infectados para prevenir la propagación de la enfermedad (Spickler, 2007).

4.4 Análisis de la identificación celular microscópico de las Micobacterias no tuberculosas por Ziehl Neelsen

Se evidenciaron variaciones en los niveles de formación de agrupaciones celulares en las muestras tratadas con la técnica de tinción ZN para cada tipo de MNT, por ejemplo, *Mycobacterium* sp., *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium paragordoniae*, *Mycobacterium cosmeticum* y *Mycobacterium porcinum* mostraron un patrón de bacilos agrupados; en *Mycobacterium abscessus* se observó la formación de bacilos unicelulares no agrupados. En las especies de micobacterias identificadas, no se observaron diferencias significativas en cuanto a las características microscópicas, a pesar de que estudios anteriores afirman una diferenciación entre diferentes especies

(Rojas Jaimes et al., 2018; Sánchez-Chardi et al., 2011). En *M. abscessus*, se observaron características distintas en comparación con otro estudio que afirma la formación de cordones (Sánchez-Chardi et al., 2011). La variedad en la existencia de cordones que se da en cada especie, especialmente cuando exhiben un patrón de agrupación pronunciado, podría estar relacionada con la capacidad virulenta de la bacteria (Julián et al., 2010).

4.5 Análisis de la identificación genotípica de especies de MNT

Las especies identificadas por secuenciación del gen 16S rRNA encontradas en muestras de órganos de tilapia, incluyen *M. fortuitum*, *M. paragordoniae*, *M. cosmeticum*, *M. abscessus*, *M. porcinum* y *M. sp* (Delghandi et al., 2020).

Según la literatura científica, el mayor número de informes de infecciones en peces se produce por *Mycobacterium fortuitum*, al igual que *M. marinum* y *M. chelonae*, se reconocen como el principal agente causante de la micobacteriosis de los peces (Hashish et al., 2018). Por lo general, estas patologías comienzan con signos clínicos inespecíficos (emaciación, comportamiento anormal, pérdida de escamas, lesión cutánea ulcerosa, deformidades esqueléticas), y luego pueden volverse crónicas con la formación de nódulos blanquecinos en los órganos parenquimatosos (hígado, bazo, riñón) (Mugetti et al., 2021)

En un estudio de laboratorio, Francis-Floyd (2011) demostró una mortalidad significativa en peces cebra infectados con *M. fortuitum*, observándose las primeras muertes alrededor del séptimo día. Este hallazgo resalta la capacidad patogénica de *M. fortuitum* en peces. Además, se ha evidenciado que esta micobacteria está asociada con lesiones similares a las causadas por *M. chelonae*, incluyendo infecciones en piel, huesos y tejidos blandos (Delghandi et al., 2020). Estas lesiones pueden afectar a individuos de cualquier edad, incluyendo pacientes aparentemente sanos con fracturas expuestas o intervenciones quirúrgicas.

En estudios de laboratorio, se ha aislado *M. fortuitum* en muestras de intestinos de peces sumergidas en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS), aunque sin signos histológicos evidentes de micobacteriosis. Se destaca que *M. fortuitum* es una bacteria

acuática común y ha sido identificada tanto en peces sanos como en aquellos afectados por la enfermedad (Mugetti et al., 2021).

En el ámbito clínico, se ha observado un aumento en la incidencia de casos de *M. fortuitum* en pacientes inmunocomprometidos, particularmente aquellos que utilizan corticosteroides como parte de su tratamiento. *Mycobacterium fortuitum*, clasificada como una MNT de rápido crecimiento, afecta a una amplia gama de animales, incluyendo humanos (Pavlik et al., 2022).

Por su parte *Mycobacterium paragordoniae* es un tipo emergente y menos común de MNT, por lo general se asocia con enfermedades pulmonares humanas, sin embargo a pesar de esta característica estudios realizados por Machida (2021) revelaron micobacteriosis del pez *Cyprinus carpio koi* causada por *M. paragordoniae* y *Mycobacterium spp*, en este estudio se realizaron análisis histopatológicos, los peces de los que se tomó las muestras mostraron letargo y emaciación (Li et al., 2022).

M. cosmeticum es una bacteria de rápido crecimiento, que se ha encontrado en salones cosméticos, entornos sanitarios y clínicos. Esta especie es el organismo micobacteriano identificable más nuevo que prospera en estos entornos, uniéndose a otras especies de rápido crecimiento como *Mycobacterium fortuitum* , *Mycobacterium chelonae* y *Mycobacterium abscessus* (García-Martos & García-Agudo, 2012). La presencia de *M. cosmeticum* en peces no es frecuente, lo que se ha realizado es estudios donde se evalúa la patogenicidad mediante infección experimental de los peces por inyección intraperitoneal, se probó cuatro desinfectantes mostrando una fuerte actividad antibacteriana, además que se promovió el desarrollo de estrategias de control para mitigar el impacto negativo de la micobacteriosis en la industria del pez luchador siamés (*Betta splendens*) (Dinh-Hung et al., 2023).

Mycobacterium abscessus es la micobacteria de rápido crecimiento aislada con mayor frecuencia en enfermedades humanas y recientemente ha surgido como responsable de infecciones pulmonares graves en pacientes con fibrosis quística (Kang et al., 2010). También se han dado casos de infecciones por *Mycobacterium abscessus* en las manos y generalmente ocurren en pacientes dedicados a la acuicultura es decir con exposición acuática frecuente y a peces contaminados (Kang et al., 2010). En la investigación realizada por Reza Delghandi (2020) se hace una revisión donde se resume los

hallazgos más recientes sobre micobacterias en peces evidenciando la presencia de *Mycobacterium abscessus* en peces como: pez cebra (*Danio rerio*), medaka (*Oryzias latipes*) y chano (*Chanos chanos*) (Delghandi et al., 2020). *Mycobacterium porcinum* es una MNT de rápido crecimiento que está genéticamente relacionada con *M. Fortuitum*. Se ha detectado en agua potable y en depósitos de aguas institucionales (Shah et al., 2020; Paul et al., 2020).

CAPÍTULO V: CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES

La eficiencia del método 2 evidenció que el HCl 1% es una buena opción como neutralizante al momento de descontaminar las muestras, creando un entorno con pH óptimo para los microorganismos con la ventaja adicional de que es un reactivo más fácil de adquirir en Ecuador en comparación con el HPC. Adicionalmente el método 2 es un método más rápido, lo que favorece su elección dentro de laboratorios de investigación. A pesar de que se observó una contaminación significativa estadísticamente en el método 2, esta no interfirió ni disminuyó la obtención de micobacterias no tuberculosas (MNT). Los medios de cultivo L-J y TSB+A mostraron un porcentaje de positividad similar para ambos métodos, lo que nos permite afirmar que son eficientes para el aislamiento selectivo de MNT; sin embargo, el TSB+A resultó ser más accesible comercialmente, lo que lo convierte en una opción conveniente para la optimización de los recursos. Aunque se detectó con mayor frecuencia el aislamiento de MNT en muestras de branquias de tilapias, esto no necesariamente indica enfermedad, sino que sirve como monitoreo de la presencia de MNT en el ambiente acuático. Por otro lado, en los órganos internos, determina el diagnóstico de micobacteriosis, lo cual podría conllevar a posibles pérdidas económicas debido al bajo desarrollo y la mortalidad de los peces. Esta situación podría prevenirse mediante el tratamiento de agua donde se cultiva la especie, evitando la aglomeración de los peces y asegurando una óptima oxigenación para prevenir el estrés y el debilitamiento del sistema inmunológico del pez. El hallazgo de diversas especies de micobacterias, incluyendo *M. fortuitum*, *M. paragordoniae*, *M. cosmeticum*, *M. abscessus*, *M. porcinum* y *M. sp.*, en muestras procesadas de órganos de tilapia, destaca la importancia de un análisis genotípico detallado para comprender la diversidad de micobacterias presentes.

REFERENCIAS

- Akbari, S., Mosavari, N., Tadayon, K., & Rahmati-Holasoo, H. (2014). Isolation of *Mycobacterium fortuitum* from fish tanks in Alborz, Iran. *Iranian Journal of Microbiology*, 6(4), 234-239.
- Ambrosio, S. R., de Deus Oliveira, E. M., Rodriguez, C. A. R., Ferreira Neto, J. S., & 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>
- Antuofermo, E., Pais, A., Polinas, M., Cubeddu, T., Righetti, M., Sanna, M. A., & Prearo, M. (2017). Mycobacteriosis caused by *Mycobacterium marinum* in reared mullets: First evidence from Sardinia (Italy). *Journal of Fish Diseases*, 40(3), 327-337. <https://doi.org/10.1111/jfd.12515>
- Arteta, A. A., Arias, L. F., & Cadavid, C. E. (2022). Coloración de Ziehl-Neelsen en el laboratorio de patología: Rendimiento y contribución al diagnóstico de micobacterias en el lavado broncoalveolar. *Biomédica*, 42(3), 460-469. <https://doi.org/10.7705/biomedica.6347>
- Barato, P., & Penagos, G. (2014, enero). *Micobacteriosis en peces ornamentales de Colombia. III Curso-Seminario Internacional de Ictiopatología*.
- Beran, V., Matlova, L., Dvorska, L., Svastova, P., & Pavlik, I. (2006). Distribution of mycobacteria in clinically healthy ornamental fish and their aquarium environment. *Journal of Fish Diseases*, 29(7), 383-393. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2006.00729.x>
- Bhavsar, D. O., Pandya, H. A., & Jasrai, Y. T. (2016). Aquaculture and Environmental Pollution -A Review work. *International Journal of Scientific Research in Science, Engineering and Technology*, 2(1), 40-45. <https://doi.org/10.32628/IJSRSET16219>
- Buitrago Portillo, F. L., & Ramírez Herrera, S. M. (2006). *Identificación de micobacterias no tuberculosas aisladas de sistemas de distribución de agua potable de la Universidad del Quindío mediante el uso de métodos convencionales y moleculares*.
- Buller, N. B. (2004). *Bacteria from fish and other aquatic animals: A practical identification manual*. CABI Pub.
- Calderón, H. (1982). *Estudio comparativo de métodos de homogenización para investigar microorganismos ácido-alcohol-resistentes*.
- Colín García, A. A. (2019). *MICOBACTERIOSIS EN PECES*. <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/105478>
- Decostere, A., Hermans, K., & Haesebrouck, F. (2004). Piscine mycobacteriosis: A literature review covering the agent and the disease it causes in fish and humans. *Veterinary Microbiology*, 99(3-4), 159-166. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2003.07.011>
- Delghandi, M. R., El-Matbouli, M., & Menanteau-Ledouble, S. (2020a). Mycobacteriosis and Infections with Non-tuberculous Mycobacteria in Aquatic Organisms: A Review. *Microorganisms*, 8(9), 1368. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091368>
- Delghandi, M. R., El-Matbouli, M., & Menanteau-Ledouble, S. (2020b). Mycobacteriosis and Infections with Non-tuberculous Mycobacteria in Aquatic Organisms: A Review. *Microorganisms*, 8(9), 1368. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091368>

- Dinh-Hung, N., Dong, H. T., Senapin, S., Pimsannil, K., Thompson, K. D., Shinn, A. P., Soontara, C., Sirimanapong, W., Chatchaiphon, S., & Rodkhum, C. (2023). Insight into characteristics and pathogenicity of five rapidly growing non-tuberculous *Mycobacterium* species isolated from the Siamese fighting fish, *Betta splendens*. *Aquaculture*, 575, 739822. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739822>
- Dorronsoro, I., & Torroba, L. (2007). Microbiología de la tuberculosis. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 30, 67-85.
- Francis-Floyd, R. (2011). *Mycobacterial infections of fish*. Southern Regional Aquaculture Center USA.
- García-Martos, P., & García-Agudo, L. (2012). Infecciones por micobacterias de crecimiento rápido. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(4), 192-200. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.09.017>
- Gauthier, D. T., & Rhodes, M. W. (2009). Mycobacteriosis in fishes: A review. *The Veterinary Journal*, 180(1), 33-47. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.05.012>
- Gcebe, N., Michel, A. L., & Hlokwé, T. M. (2018). Non-tuberculous *Mycobacterium* species causing mycobacteriosis in farmed aquatic animals of South Africa. *BMC Microbiology*, 18, 32. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1177-9>
- Hammer-Dedet, F., Dupont, C., Evrevin, M., Jumas-Bilak, E., & Romano-Bertrand, S. (2021). Improved detection of non-tuberculous mycobacteria in hospital water samples. *Infectious Diseases Now*, 51(5), 488-491. <https://doi.org/10.1016/j.idnow.2021.04.003>
- Harriff, M. J., Bermudez, L. E., & Kent, M. L. (2007). Experimental exposure of zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton), to *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium peregrinum* reveals the gastrointestinal tract as the primary route of infection: A potential model for environmental mycobacterial infection. *Journal of Fish Diseases*, 30(10), 587-600. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2007.00839.x>
- Hashish, E., Merwad, A., Elgaml, S., Amer, A., Kamal, H., Elsadek, A., Marei, A., & Sitohy, M. (2018). *Mycobacterium marinum* infection in fish and man: Epidemiology, pathophysiology and management; a review. *Veterinary Quarterly*, 38(1), 35-46. <https://doi.org/10.1080/01652176.2018.1447171>
- Hatem, M., Nasr, E., Marzouk, M., Mohamed, F., & Mohamed, M. (2021). Comparison between conventional and recent culture methods for detection of fish mycobacteria. *New Valley Veterinary Journal*, 1(1), 1-8. <https://doi.org/10.21608/nvvj.2021.177229>
- Jácome, J., Quezada Abad, C., Sánchez Romero, O., Pérez, J. E., & Nirchio, M. (2019). Tilapia en Ecuador: Paradoja entre la producción acuícola y la protección de la biodiversidad ecuatoriana. *Revista Peruana de Biología*, 26(4), 543-550. <https://doi.org/10.15381/rpb.v26i4.16343>
- Jankute, M., Cox, J. A. G., Harrison, J., & Besra, G. S. (2015). Assembly of the *Mycobacterium* Cell Wall. *Annual Review of Microbiology*, 69, 405-423. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104121>
- Jernigan, J. A., & Farr, B. M. (2000). Incubation Period and Sources of Exposure for Cutaneous *Mycobacterium marinum* Infection: Case Report and Review of the Literature. *Clinical Infectious Diseases*, 31(2), 439-443. <https://doi.org/10.1086/313972>

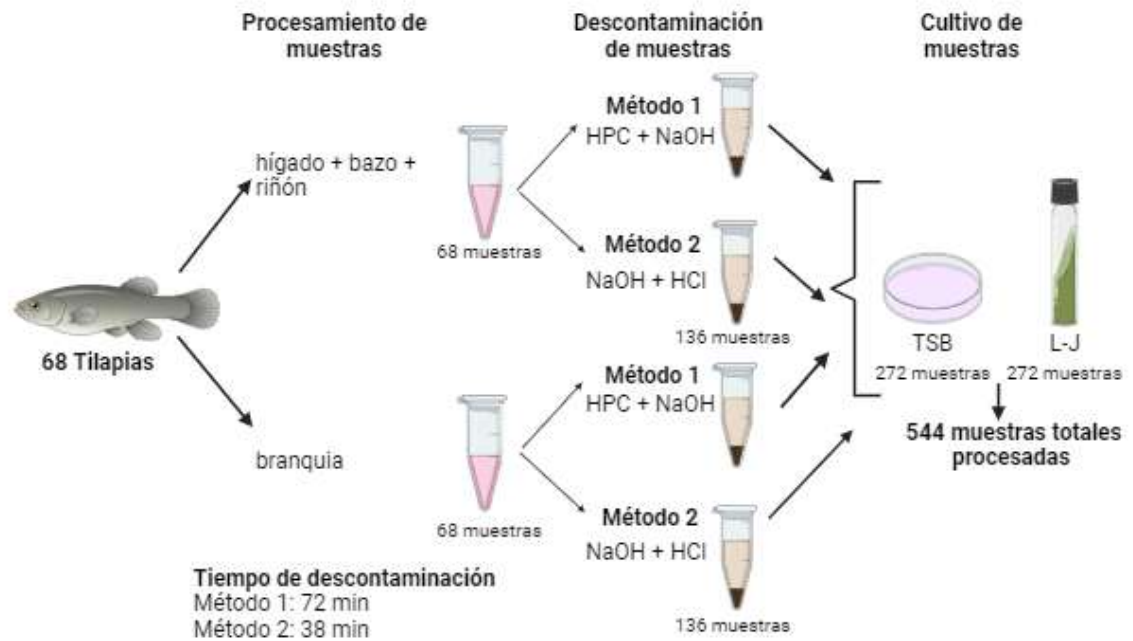
- Julián, E., Roldán, M., Sánchez-Chardi, A., Astola, O., Agustí, G., & Luquin, M. (2010). Microscopic Cords, a Virulence-Related Characteristic of *Mycobacterium tuberculosis*, Are Also Present in Nonpathogenic Mycobacteria. *Journal of Bacteriology*, 192(7), 1751-1760. <https://doi.org/10.1128/JB.01485-09>
- Kaattari, I. M., Rhodes, M. W., Kaattari, S. L., & Shotts, E. B. (2006). The evolving story of *Mycobacterium tuberculosis* clade members detected in fish. *Journal of Fish Diseases*, 29(9), 509-520. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2006.00744.x>
- Kang, G. C. W., Gan, A. W. T., Yam, A., Tan, A. B. H., & Tay, S. C. (2010). Mycobacterium abscessus Hand Infections in Immunocompetent Fish Handlers: Case Report. *The Journal of Hand Surgery*, 35(7), 1142-1145. <https://doi.org/10.1016/j.jhsa.2010.04.015>
- Koentjoro, M. P., Donastin, A., & Prasetyo, E. N. (2021). A SIMPLE METHOD OF DNA EXTRACTION OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS FROM SPUTUM CULTURES FOR SEQUENCING ANALYSIS. *African Journal of Infectious Diseases*, 15(2s), 19-22. <https://doi.org/10.21010/ajid.v15i2s.2>
- Ledesma, Y., Echeverría, G., Claro-Almea, F. E., Silva, D., Guerrero-Freire, S., Rojas, Y., Bastidas-Caldes, C., Navarro, J. C., & De Waard, J. H. (2022). The Re-Identification of Previously Unidentifiable Clinical Non-Tuberculous Mycobacterial Isolates Shows Great Species Diversity and the Presence of Other Acid-Fast Genera. *Pathogens*, 11(10), 1159. <https://doi.org/10.3390/pathogens11101159>
- Li, Y., Zhang, W., Zhao, J., Lai, W., Zhao, Y., Li, Y., & Qu, J. (2022). *Mycobacterium paragordoniae* is an emerging pathogen in human pulmonary disease: Clinical features, antimicrobial susceptibility testing and outcomes. *Emerging Microbes & Infections*, 11(1), 1973-1981. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2103453>
- López Pérez, J. P. (2008). Introducción a la anatomía externa e interna de un vertebrado. Aplicación en el laboratorio de educación secundaria. *Revista Eureka sobre enseñanza y divulgación de las ciencias.*, 5(1), 107-109. https://doi.org/10.25267/Rev_Eureka_ensen_divulg_cienc.2008.v5.i1.12
- Lorencova, A., Klanicova, B., Makovcova, J., Slana, I., Vojkovska, H., Babak, V., Pavlik, I., & Slany, M. (2013a). Nontuberculous Mycobacteria in Freshwater Fish and Fish Products Intended for Human Consumption. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(6), 573-576. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1419>
- Lorencova, A., Klanicova, B., Makovcova, J., Slana, I., Vojkovska, H., Babak, V., Pavlik, I., & Slany, M. (2013b). Nontuberculous mycobacteria in freshwater fish and fish products intended for human consumption. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(6), 573-576. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1419>
- Mugetti, D., Tomasoni, M., Pastorino, P., Esposito, G., Menconi, V., Dondo, A., & Prearo, M. (2021). Gene Sequencing and Phylogenetic Analysis: Powerful Tools for an Improved Diagnosis of Fish Mycobacteriosis Caused by *Mycobacterium fortuitum* Group Members. *Microorganisms*, 9(4), 797. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040797>
- Orjuela Leguizamón, H. A., Pérez Guerra, J. R., & Pinzón Grisales, C. L. (2021). Micobacteriosis en peces ornamentales y su posible implicación en la salud pública. Revisión. *instname:Universidad Antonio Nariño*. <http://repositorio.uan.edu.co/handle/123456789/5113>

- Pate, M., Jencic, V., Zolnir-Dovc, M., & Ocepek, M. (2005). Detection of mycobacteria in aquarium fish in Slovenia by culture and molecular methods. *Diseases of Aquatic Organisms*, 64, 29-35. <https://doi.org/10.3354/dao064029>
- Paul, G. R., Leber, A., Nemastil, C. J., Novak, K. J., Brady, M., Stack-Simone, S., Greninger, A. L., & Antonara, S. (2020). Identification of *Mycobacterium porcinum* in patients with cystic Fibrosis: Pathogen or contaminant? *Journal of Cystic Fibrosis*, 19(4), 580-586. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2020.01.004>
- Pavlik, I., Ulmann, V., & Falkinham, J. O. (2022). Nontuberculous Mycobacteria: Ecology and Impact on Animal and Human Health. *Microorganisms*, 10(8), 1516. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081516>
- Peterson, T., Ferguson, J., Watral, V., Mutoji, K., Ennis, D., & Kent, M. (2013). *Paramecium caudatum* enhances transmission and infectivity of *Mycobacterium marinum* and *M. chelonae* in zebrafish *Danio rerio*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 106(3), 229-239. <https://doi.org/10.3354/dao02649>
- Ranzani-Paiva, M. J. T., Ishikawa, C. M., Eiras, A. C. D., & Silveira, V. R. D. (2004). Effects of an experimental challenge with *Mycobacterium marinum* on the blood parameters of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47(6), 945-953. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132004000600014>
- Rao, M., Streur, T. L., Aldwell, F. E., & Cook, G. M. (2001). Intracellular pH regulation by *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Microbiology (Reading, England)*, 147(Pt 4), 1017-1024. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-4-1017>
- Rhodes, M., Kator, H., Kaattari, I., Gauthier, D., Vogelbein, W., & Ottinger, C. (2004). Isolation and characterization of mycobacteria from striped bass *Morone saxatilis* from the Chesapeake Bay. *Diseases of Aquatic Organisms*, 61, 41-51. <https://doi.org/10.3354/dao061041>
- Rojas Jaimes, J., Giraldo-Chavez, J., Huyhua-Flores, Y., & Caceres-Nakiche, T. (2018a). Identificación de micobacterias en medio sólido mediante microscopía de fase invertida y tinción Ziehl-Neelsen. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 35(2), 279-284. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.352.3471>
- Rojas Jaimes, J., Giraldo-Chavez, J., Huyhua-Flores, Y., & Caceres-Nakiche, T. (2018b). Visualización microscópica de cordones de micobacterias en medio 7H11 y diferenciación mediante tinción Ziehl-Neelsen. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 35, 344-346. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.352.3475>
- Ryan, K. J., & Ray, C. G. (2017). Micobacterias. En *Sherrie. Microbiología médica*, 6e (1-Book, Section). McGraw-Hill Education. accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?aid=1143535783
- Sánchez-Chardi, A., Olivares, F., Byrd, T. F., Julián, E., Brambilla, C., & Luquin, M. (2011). Demonstration of Cord Formation by Rough *Mycobacterium abscessus* Variants: Implications for the Clinical Microbiology Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(6), 2293-2295. <https://doi.org/10.1128/JCM.02322-10>
- Shah, S., Rudrappa, M., Leon, J., & Shah, K. (2020). MYCOBACTERIUM PORCINUM CAUSING A FALSE-POSITIVE QUANTIFERON TB-GOLD TEST. *Chest*, 158(4), A2531. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2020.09.131>

- Shukla, S., Sharma, R., & Shukla, S. K. (2013). Detection and identification of globally distributed mycobacterial fish pathogens in some ornamental fish in India. *Folia Microbiologica*, 58(5), 429-436. <https://doi.org/10.1007/s12223-013-0225-y>
- Slany, M., Makovcova, J., Jezek, P., Bodnarova, M., & Pavlik, I. (2014). Relative prevalence of *Mycobacterium marinum* in fish collected from aquaria and natural freshwaters in central Europe. *Journal of Fish Diseases*, 37(6), 527-533. <https://doi.org/10.1111/jfd.12135>
- Spickler, A. (2007). *Micobacteriosis*. The Center for Food Security and Public Health.
- Tesemma, W., Keffale, M., & Adugna, S. (2019). Fish mycobacteriosis: Review. *Global Veterinary*, 21(6).
- Ucko, M., Colorni, A., Kvitt, H., Diamant, A., Zlotkin, A., & Knibb, W. R. (2002). Strain Variation in *Mycobacterium marinum* Fish Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), 5281-5287. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5281-5287.2002>
- Valdés, F., & Cid, A. (2004). Micobacterias atípicas. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 95(6), 331-357.
- Valera A., A., Jurado P., J., Manchego S., A., & Sandoval C., N. (2018). Aislamiento bacteriológico y caracterización de lesiones histopatológicas en tetra bleeding heart (*Hyphessobrycon erythrostigma*) de la cuenca Amazónica Peruana. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(1), 288-301. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i1.14080>
- Vatsos, I. N., Thompson, K. D., & Adams, A. (2006). Colonization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), eggs by *Flavobacterium psychrophilum*, the causative agent of rainbow trout fry syndrome. *Journal of Fish Diseases*, 29(7), 441-444. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2006.00735.x>
- Whitten, K. W., Gailey, K. D., Davis, R. E., de Sandoval, M. T. A. O., & Muradás, R. M. G. (1992). *Química general*. McGraw-Hill.
- Zanoni, R. G., Florio, D., Fioravanti, M. L., Rossi, M., & Prearo, M. (2008). Occurrence of *Mycobacterium* spp. in ornamental fish in Italy. *Journal of Fish Diseases*, 31(6), 433-441. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2008.00924.x>

CAPÍTULO VI: ANEXOS

Anexo 1. Diseño experimental.



Anexo 2. Tabla de datos resumida.

V. Independientes			V. Dependiente
Método	Órgano	Medio	Micobacterias
A	Organo1	Medio1	1
A	Organo2	Medio1	0
A	Organo1	Medio2	0
A	Organo2	Medio2	0
B	Organo1	Medio1	0
B	Organo2	Medio1	0
B	Organo1	Medio2	0
B	Organo2	Medio2	0
A	Organo1	Medio1	0
A	Organo2	Medio1	0
A	Organo1	Medio2	0
A	Organo2	Medio2	1
B	Organo1	Medio1	1
B	Organo2	Medio1	0

B	Organo1	Medio2	1
B	Organo2	Medio2	0
.			
.			
.			
B	Organo2	Medio2	0