

# Evaluación de metodologías de aislamiento de micobacterias no tuberculosas en Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*)

S. Gaibor<sup>1</sup>, L. Vásquez<sup>1</sup>, A. Castro<sup>2</sup>, Y. Rojas<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidad Regional Amazónica Ikiam, Tena, Ecuador.

<sup>2</sup> Laboratorio de Biología Molecular Docencia, Universidad Regional Amazónica Ikiam, Tena, Ecuador.

<sup>3</sup> Grupo de Investigación de Microbiología Aplicada, Universidad Regional Amazónica Ikiam, Tena, Ecuador.

## Introducción

El género *Mycobacterium* pertenece a la familia Mycobacteriaceae, se caracteriza por ser bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) con una alta cantidad de lípidos en su pared celular, como ácido micólicos y lipoarabinomananos, lo que les confiere una notable complejidad (1). Estas bacterias, incluyen **patógenos estrictos** como *M. tuberculosis* y *M. leprae*, así como un grupo denominado **micobacterias no tuberculosas (MNT)** distribuidas en suelo, agua y animales, y que en ocasiones pueden ser patógenos oportunistas como *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, entre otras (2). Las MNT, se ha reportado como responsables de infecciones en animales acuáticos, especialmente peces de uso comercial y ornamental. Estas MNT pueden causar un grupo de enfermedades conocidas como **micobacteriosis**, cuyas características varían según el órgano afectado e incluye manifestaciones como la decoloración en la piel, úlceras cutáneas y deformidades **Ver figura 1**. Debido a la creciente preocupación por los efectos de las micobacterias en animales y humanos una parte de las investigaciones se dirigen hacia el desarrollo de métodos de identificación precisos, efectivos y cada vez menos laboriosos (3). La tinción de Ziehl-Neelsen permite visualizar BAAR, sin embargo, el cultivo en medios selectivos (ejm: Lowenstein-Jensen) combinado con técnicas moleculares han permitido aislar e identificar las especies de MNT.



Figura 1: Micobacteriosis en peces

## Objetivo

Comparar la eficiencia en el aislamiento de dos metodologías de pretratamiento y dos medios de cultivos selectivos durante la detección de micobacterias no tuberculosas (MNT) en muestras de órganos de tilapia.

## Métodos

Se recolectaron un total de 68 tilapias de tres puntos de expendio de peces del cantón Tena. De cada animal, se tomaron muestras de branquias y órganos internos (pool de hígado, bazo y riñón) que después de haber sido sometidos a dos métodos de descontaminación diferentes (MD-1) y (MD-2), se cultivaron en medio L-J y medio agar tripticasa soya más antibiótico (TSB+A). Ambos métodos modificados de literatura difieren en las sustancias descontaminantes y en el número de lavados; MD-1 se utilizó como descontaminantes NaOH 4% + HPC (4), mientras que MD-2 NaOH 4% + HCl 1% (5) **Ver figura 2**.

A las muestras positivas se las caracterizó microscópicamente mediante la tinción Ziehl-Neelsen, a los cultivos axénicos se extrajo ADN y finalmente las especies fueron identificadas por secuenciación del gen 16S rRNA **Ver figura 3**.

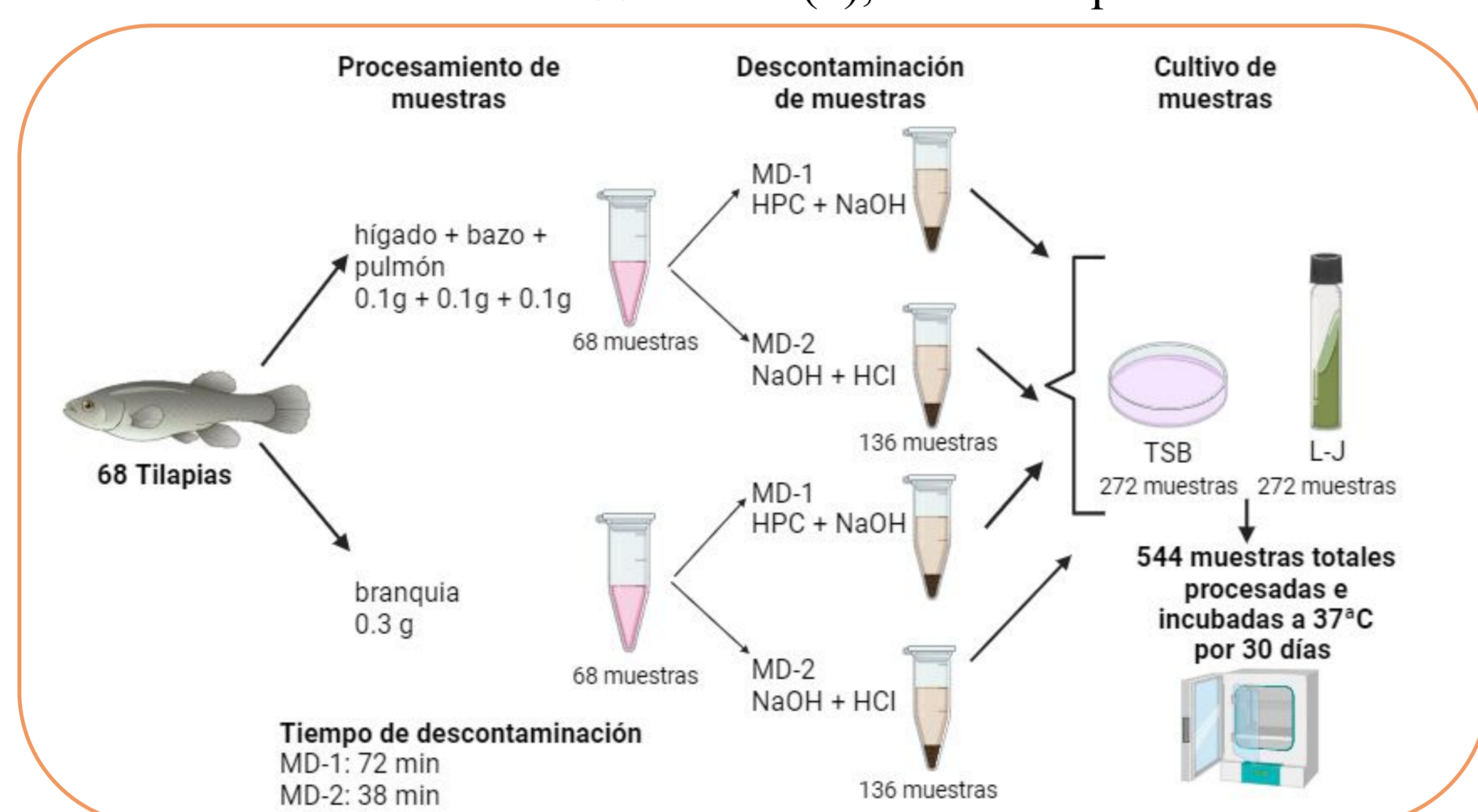


Figura 2: Procesamiento, descontaminación y cultivo de muestras de órganos de tilapia

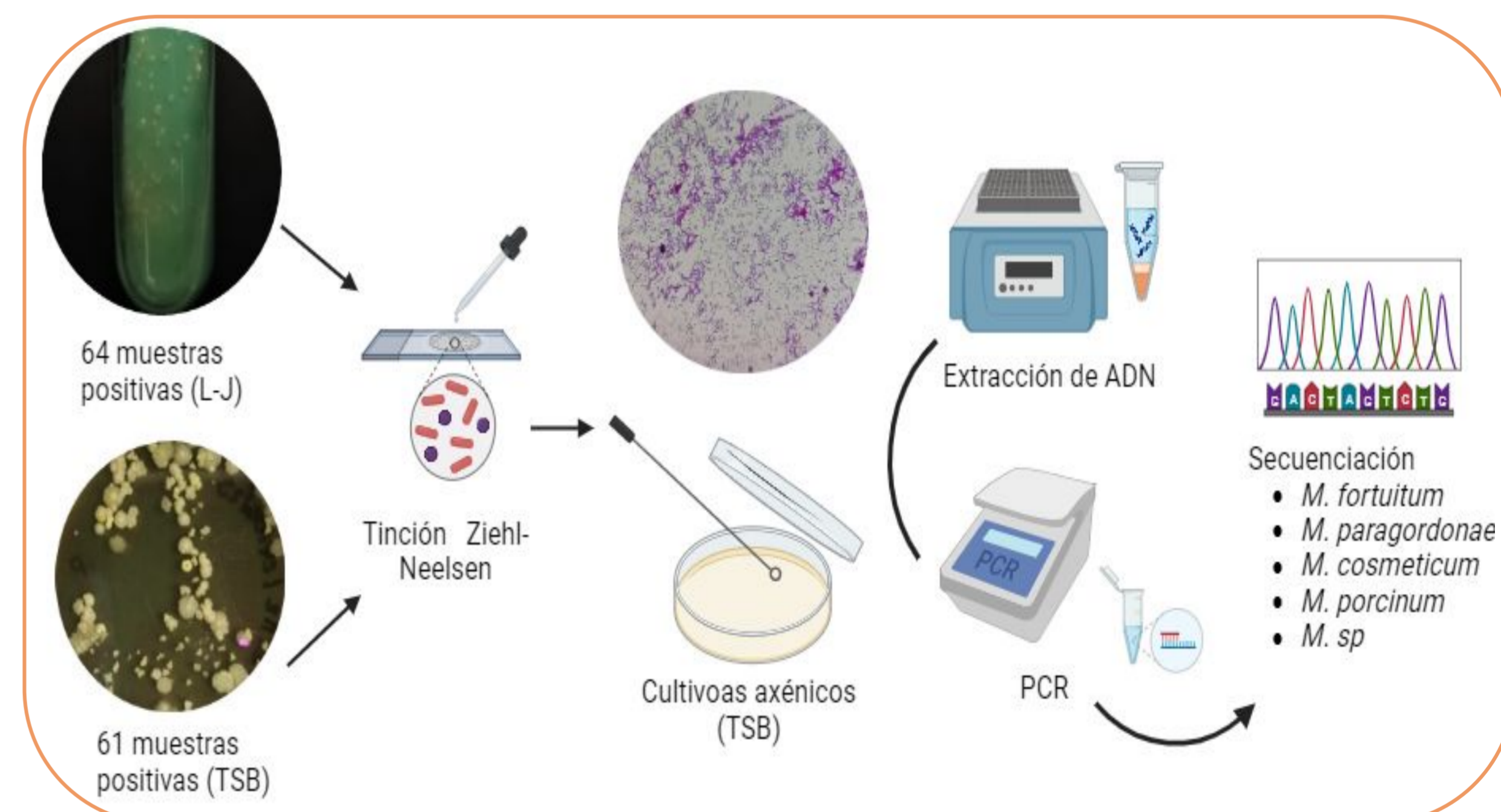


Figura 3: Caracterización fenotípica y molecular de MNT

## Resultados

64.7% de los peces analizados resultaron positivos para MNT. Con un total de 544 observaciones (MD-1 y MD-2, y medios LJ y TSB+A), se obtuvo una positividad individual para MD-1 y MD-2 fue del 19.1 % y 26.84%, respectivamente **Ver figura 4**. El 23.5% de LJ mostraron crecimiento de colonias en comparación de los medios TSB+A, que registraron un 22.4% de positividad. Se observó una tasa de contaminación del 5% en MD-1 y del 6.5 % para MD-2. Entre las especies identificadas por secuenciación encontramos: *M. fortuitum*, *M. paragordoniae*, *M. cosmeticum*, *M. porcinum*, y *M. sp*.

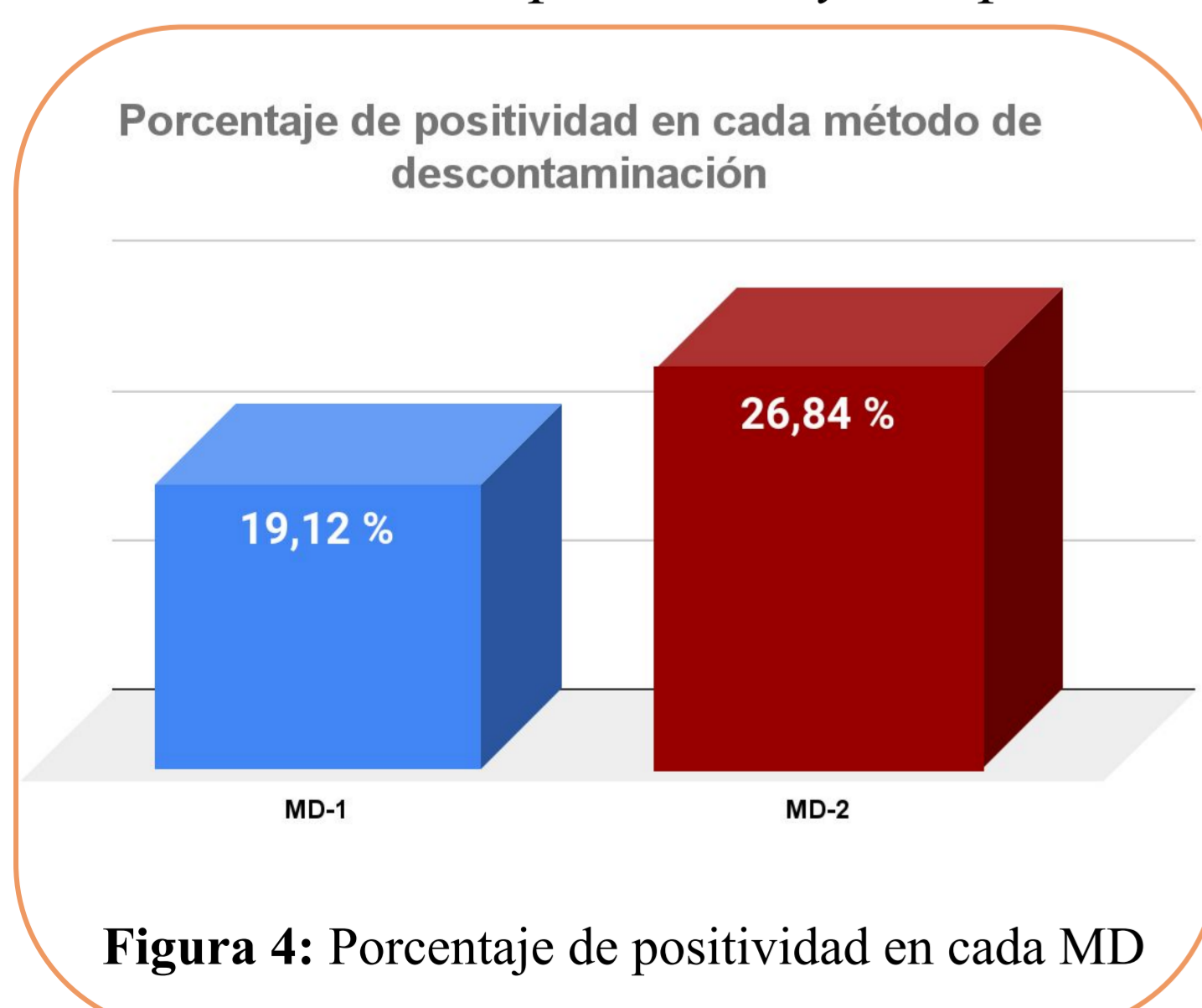


Figura 4: Porcentaje de positividad en cada MD

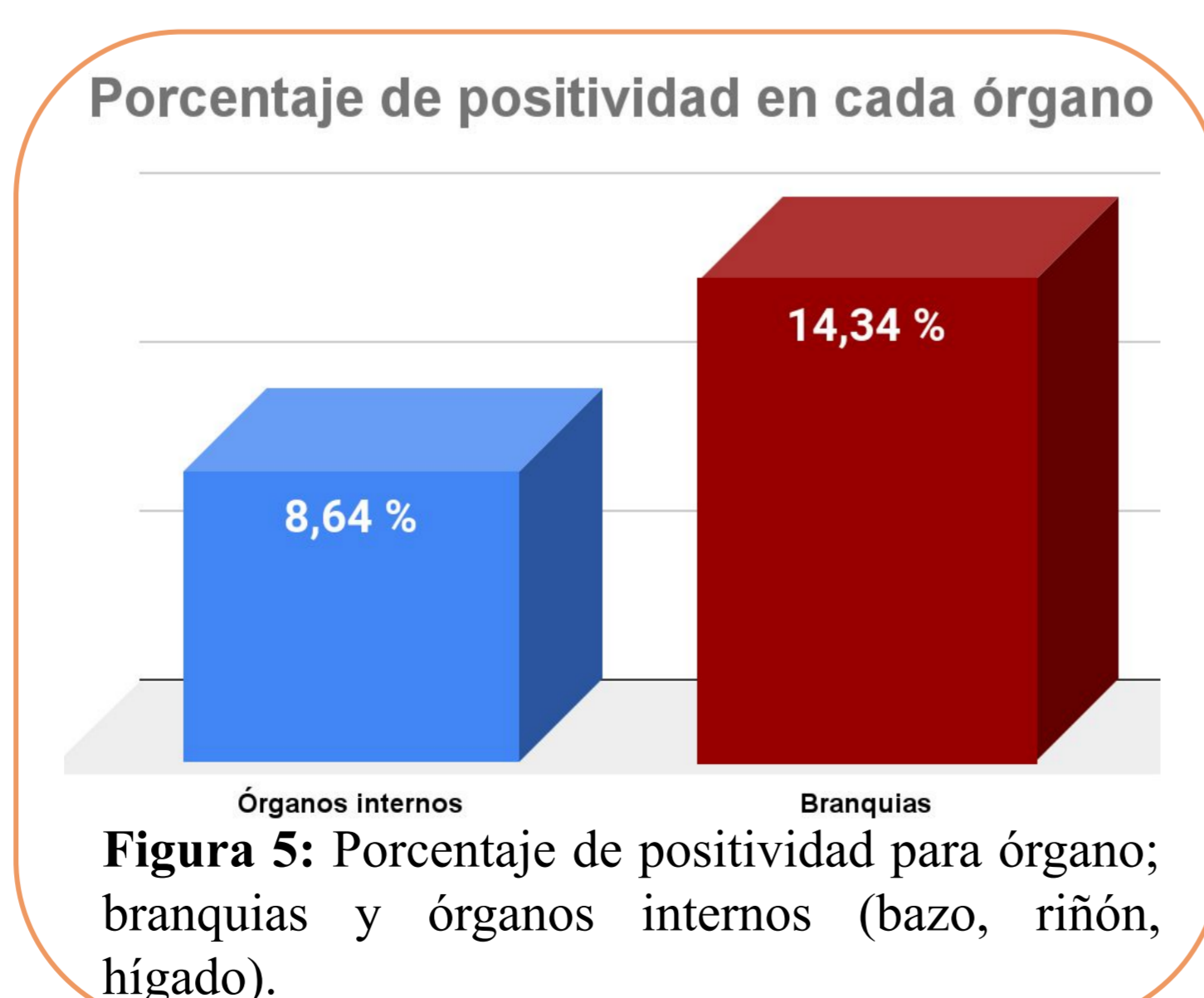


Figura 5: Porcentaje de positividad para órgano; branquias y órganos internos (bazo, riñón, hígado).

## Conclusión y discusión

La eficiencia del MD-2 fue mayor debido a que mostró 7.7 % más muestras positivas que el MD-1, demostrando que el **HCl 1%**, tiene **mayor eficiencia en la recuperación** de micobacterias con la ventaja adicional de que es un reactivo más fácil de adquirir en Ecuador en comparación con el HPC. Adicionalmente el MD-2 es un método más rápido, lo que favorece su elección dentro de laboratorios de investigación, tomando en cuenta que ambos métodos generan baja contaminación en los medios de cultivo con capacidad similar de eliminar la flora asociada de las muestras. 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 en nuestro país es más accesible comercialmente, lo que lo convierte en una opción conveniente para la optimización de los recursos. El aislamiento de especies de MNT en muestras de branquias de Tilapias fue más frecuente pero esto **no necesariamente indica enfermedad**, sino que sirve como monitoreo de la presencia de MNT en el ambiente acuático; sin embargo, en órganos si determina el diagnóstico de micobacteriosis lo cual conlleva a posibles pérdidas económicas por el bajo desarrollo del pez y la muerte de estos animales. Estos protocolos se están desarrollando por **primera vez en el país**, y los resultados demuestra la importancia de continuar investigando en el campo de la microbiología acuícola en Ecuador para fundamentar el establecimiento de medidas de prevención de la enfermedad tanto en animales como en humanos.

## Referencias:

- 1.- Jankute, Monika et al. "Assembly of the Mycobacterial Cell Wall." *Annual review of microbiology* vol. 69 , 2015.
- 2.- M. R. Delghandi, M. El-Matbouli, y S. Menanteau-Ledouble, «Mycobacteriosis and Infections with Non-tuberculous Mycobacteria in Aquatic Organisms: A Review», *Microorganisms*, vol. 8, n.º 9, sep, 2020.
- 3.-Dorronsoro, I., & Torroba, L..Microbiología de la tuberculosis. *Anales Sis San Navarra*, Pamplona , v. 30, supl. 2, p. 67-85, 2007 .



Referencias