
UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Trabajo de Fin de Máster Titulado:

“Identificación filogenética de especies de micobacterias no tuberculosas (MNT) de muestras clínicas mediante análisis de los genes 16S rRNA, *rpoB* y *hsp65*”

Realizado por:

GABRIELA FERNANDA SEVILLANO MERA

Director del proyecto:

Dr. Juan Carlos Navarro C., Ph.D.

Como requisito para la obtención del título de:

MAGISTER EN BIOMEDICINA

Quito, 13 de marzo de 2023

ANEXO B

DECLARACION JURAMENTADA

Yo, **Gabriela Sevillano**, con cédula de identidad 1726261983 declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

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



FIRMA

Cédula. 1726261983

ANEXO C

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

“Identificación filogenética de especies de micobacterias no tuberculosas (MNT) de muestras clínicas mediante análisis de los genes 16S rRNA, *rpoB* y *hsp65*”

Realizado por:

Gabriela Fernanda Sevillano Mera

como Requisito para la Obtención del Título de:

MAGISTER EN BIOMEDICINA

ha sido dirigido por el profesor

JUAN CARLOS NAVARRO C.

quien considera que constituye un trabajo original de su autor



FIRMA

ANEXO D

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

LINO ARISQUETA HERRANZ

JOSE RUBEN RAMÍREZ

Después de revisar el trabajo presentado,
lo han calificado como apto para su defensa oral ante
el tribunal examinador



FIRMA



FIRMA

Quito, 13 de marzo de 2023

1

DEDICATORIA

2

A mis padres,

3

mi hermanas y sobrinos.

4

5

6

AGRADECIMIENTO

7

A mi familia, por su amor incondicional.

8

A mis profesores del programa de Maestría, por compartir sus conocimientos.

9

Al grupo de investigación de la Unidad de Investigaciones en Biomedicina de Zurita & Zurita

10

Laboratorios, en especial a la Dra. Jeannete Zurita, por todo su apoyo a nivel personal, académico y

11

profesional

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

Este trabajo de tesis fue realizado bajo el Programa de Investigación:

SALUD GLOBAL

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Proyecto DII-P011617_2 (JCN)

25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65



Artículo de tesis

Identificación filogenética de especies de micobacterias no tuberculosis (MNT) de muestras clínicas mediante análisis de los genes 16S rRNA, *rpoB* y *hsp65*

Gabriela Sevillano^{1,2}, Jeannete Zurita¹, Juan Carlos Navarro³, *

1 Unidad de Investigaciones en Biomedicina. Zurita & Zurita Laboratorios.

2 Maestría de Biomedicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Internacional SEK, Quito, Ecuador

3 Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Internacional SEK, Quito, Ecuador.

* Autor de Correspondencia: juancarlos.navarro@uisek.edu.ec; Tel.: +593995479569

Resumen: Debido al tratamiento diferencial que requieren las infecciones por micobacterias no tuberculosis (MNT), es necesaria la identificación precisa en aislamientos clínicos, para un manejo correcto, tratamiento eficaz y estrategias de control apropiadas. Los métodos tradicionales, incluidas las pruebas fenotípicas, son lentos, engorrosos y, a menudo, no definitivos. Los métodos basados en PCR, como el análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (PRA), aún consumen mucho tiempo y, en ocasiones, conducen a una identificación inexacta debido a que manejan fragmentos de secuencias diferenciales, pero no de acuerdo a su origen evolutivo. La secuenciación es el método más preciso para la identificación de especies, siendo los genes 16S rRNA, *hsp65* y *rpoB* considerados como candidatos para estudios filogenéticos y diagnóstico. En este estudio, desarrollamos un análisis filogenético utilizando las secuencias de los genes 16S rRNA, *hsp65* y *rpoB* de aislados clínicos de *Mycobacterium*, recolectados entre 2019 y 2022 para la categorización taxonómica de especies de *Mycobacterium* y evaluamos su uso para la identificación de especies de *Mycobacterium* de interés clínico. Además, analizamos la correlación genotipo-fenotipo usando características como origen de la muestra, tasa de crecimiento y resistencia a antimicrobianos. Se construyó una matriz de alineamiento con base en las secuencias propias y un muestreo del NCBI y se realizaron los análisis filogenéticos mediante PAUP 4.0. Los marcadores *rpoB* y *hsp65*, mostraron información filogenética a nivel de grupos de especies y subespecies, mientras que el gen 16S rRNA, se mostró como el gen más conservado, y arrojó una estructura a nivel de complejos de especies que puede ser utilizado como un primer nivel de identificación. Los caracteres sinapomórficos variaron entre genes analizados, observándose una correlación con el fenotipo. Las muestras clínicas mostraron homología filogenética con los grupos de *M. abscessus*, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. bovis*, *M. fortuitum*, *M. intracellulare* y *M. africanum*.

Palabras clave: taxonomía, especies, subespecies, homología filogenética, aislados clínicos, genes conservados.

Abstract: Due to the differential treatment required by non-tuberculous mycobacteria (NTM) infections, accurate identification in clinical isolates is necessary for correct management, effective treatment and appropriate control strategies. Traditional methods, including phenotypic tests, are slow, cumbersome, and often not definitive. PCR-based methods, such as restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis,

are still very time consuming and sometimes lead to inaccurate identification because they handle fragments of differential sequences, but do not agree to its evolutionary origin. Sequencing is the most accurate method for species identification, with the 16S rRNA, *hsp65*, and *rpoB* genes being considered as candidates for phylogenetic and diagnostic studies. In this study, we developed a phylogenetic analysis using the 16S rRNA, *hsp65*, and *rpoB* gene sequences of *Mycobacterium* clinical isolates, collected between 2019 and 2022 for taxonomic categorization of *Mycobacterium* species, and evaluated their use for *Mycobacterium* species identification of clinical interest. In addition, we analyzed the genotype-phenotype correlation using characteristics such as sample origin, growth rate, and antimicrobial resistance. An alignment matrix was built based on own sequences and NCBI sampling, and phylogenetic analyzes were performed using PAUP 4.0. The *rpoB* and *hsp65* markers showed phylogenetic information at the level of groups of species and subspecies, while the 16S rRNA gene was shown to be the most conserved gene, yielding a structure at the level of species complexes that can be used as a first level of identification. The synapomorphic characters varied between genes analyzed, observing a correlation with the phenotype. The clinical samples showed phylogenetic homology with the groups of *M. abscessus*, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. bovis*, *M. fortuitum*, *M. intracellulare* and *M. africanum*.

Keywords: taxonomy, species, subspecies, phylogenetic homology, clinical isolates, conserved genes.

1. Introducción

Las especies de micobacterias no tuberculosis (MNT), son un grupo de organismos ambientales, que pueden encontrarse en el agua, incluida el agua potable, el suelo, animales, plantas, alimentos, vegetación y las heces humanas. Estas especies tienen un potencial de causar diversas patologías, que varían desde infecciones pulmonares, cutáneas y de tejidos blandos hasta infecciones más profundas con o sin diseminación sistémica. Algunas especies de MNT son patógenos bien reconocidos, mientras que otras están emergiendo recientemente y aún no se conoce su potencial patogénico (Eisenstadt & Hall, 1995; Rahama & Thaker, 2013).

Actualmente, las enfermedades causadas por MNT aun aumentado en comparación con *M. tuberculosis*, esto puede estar relacionado con la introducción de técnicas de laboratorio más sensibles, al desarrollo de técnicas genómicas que permiten un diagnóstico más rápido de enfermedades micobacterianas y una diferenciación más rápida de MNT (Field & Cowie, 2006). Se han identificado más de 150 especies de *Mycobacterium* y, el rápido aumento de especies identificadas se debe al avance de las técnicas genéticas (Tortoli, 2003). El progreso de la genética y el desarrollo de modelos matemáticos para el análisis, además de la aportación de la red global de secuencias genéticas disponibles en tiempo real en bases de datos de dominio público han contribuido al avance y uso más común de los análisis filogenéticos (Faria et al., 2015).

Los estudios filogenéticos y taxonómicos de las especies de *Mycobacterium* se han basado en su gran mayoría en el análisis del gen 16sRNA. Su alto contenido de información, naturaleza conservada y presencia en todos los organismos han hecho de este gen un candidato apropiado para el análisis filogenético y para la identificación. Sin embargo, todavía tiene algunas limitaciones, como es principalmente la similitud genética (superior al 94%) que existe entre especies de los miembros del género *Mycobacterium* (Devulder et al., 2005). Por esta razón, la combinación de análisis de marcadores como *rpoB* y *hsp65* con el análisis del gen 16S rRNA se ha convertido en un sistema eficaz para la identificación de especies de micobacterias (Maleki et al., 2017). Siendo el gen de la proteína de choque térmico de 65 kDa (*hsp65*) altamente conservado entre las especies de micobacterias con regiones hipervariables (Telenti et al., 1993) y el gen *rpoB* que codifica la subunidad β de la ARN polimerasa y contiene regiones de secuencias conservadas que flanquean regiones altamente variables (Boor et al., 1995), utilizados como una herramientas alternativas o complementarias para identificar micobacterias (Adékambi et al., 2003).

La identificación correcta de las especies MNT es importante para elegir el tratamiento adecuado de los pacientes o para propósitos epidemiológicos (Huang et al., 2020). El tratamiento va a depender de la especie de

NTM. Según la especie este, puede ir desde el uso de antimicrobianos solos o en combinación, el uso de antifímicos (anti-tuberculosos), hasta la debridación quirúrgica. Por lo tanto, la identificación de la mayoría de los aislamientos de NTM debe alcanzar a nivel de especie y no únicamente como grupos de especies (Griffith et al., 2007), no solo para el tratamiento sino también para establecer si se trata de un colonizador de la muestra clínica o un verdadero patógeno.

Las especies de MNT se clasifican tradicionalmente según sus tasas de crecimiento, en micobacterias de crecimiento rápido (MCR) y micobacterias de crecimiento lento (MCL). Las especies que forman colonias visibles en una placa de subcultivo en 3 a 7 días se clasifican como MCR, mientras que las especies que tardan más de 7 días en formar una colonia visible se clasifican como MCL (Runyon, 1965).

Debido a que las MNT son un grupo heterogéneo de microorganismos, la susceptibilidad a los medicamentos varía mucho dentro de las especies (Zhou et al., 2020). Actualmente, el tratamiento de casi todas las infecciones por MCR incluye antibióticos como macrólidos (claritromicina, azitromicina), sulfas (trimetoprima-sulfametoxazol), aminoglucósidos (amikacina, tobramicina), quinolonas (moxifloxacino, ciprofloxacino), oxazolidinonas (linezolid), cefamicinas (cefexitina), carbapenémicos (imipenem) y tetraciclinas (minociclina, doxiciclina y tigeciclina). Mientras que para las infecciones causadas por el grupo de MCL, el régimen además incluye etambutol, isoniazida, streptomina y rifampicina (anti-tuberculosos) (Saxena et al., 2021).

Las diferencias en la susceptibilidad a los antimicrobianos que determinan las opciones de tratamiento entre las diferentes micobacterias, suponen que la identificación de las MNT a nivel de especie sea cada vez más importante desde el punto de vista clínico. Las pruebas de susceptibilidad a las micobacterias, por lo tanto, son importantes para el manejo adecuado del paciente y debe realizarse en aislamientos clínicamente significativos de ciertas micobacterias no tuberculosas (MNT) (Griffith et al., 2007).

Aunque las variaciones intraespecíficas e interespecíficas entre micobacterias de diferentes regiones geográficas se han estudiado ampliamente utilizando secuencias de ADN de los genes *16S rRNA*, *rpoB* y *hsp65*, para estudios genéticos ecológicos, análisis filogenéticos y evolutivos, existe una escasez de información sobre la variación genética entre micobacterias aisladas de poblaciones de varias regiones geográficas donde la infección por micobacterias es un importante problema de salud (Hoefsloot et al., 2013). Ecuador dispone de información limitada sobre la diversidad genética y epidemiológica de micobacterias aisladas de muestras humanas (Buela Chica, 2021) y en mayor proporción en NTM ambientales (Muşoiu Cedeño, 2020).

Por lo tanto, en este estudio, planteamos desarrollar un análisis filogenético mediante el uso de las secuencias de los genes *16S rRNA*, *hsp65* y *rpoB* para la categorización taxonómica e identificación certera de especies, la correlación genotipo-fenotipo y la comprensión de la prevalencia y estructura filogenética de las MNT aisladas de muestras clínicas de un laboratorio privado de la ciudad de Quito, Ecuador.

2. Materiales and Métodos

2.1. Muestras/secuencias seleccionadas para el estudio

Se seleccionaron todas las muestras del género *Mycobacterium spp.* almacenadas en el servicio de Microbiología de Zurita & Zurita Laboratorios durante el período 2018-2022 de cultivos bacterianos provenientes con origen respiratorio y no respiratorio, para un total de 57 muestras amplificadas por PCR y secuenciadas.

Previamente, las MNT fueron identificadas usando la tinción acidorresistente acidorresistente (Ziehl-Neelsen). Las muestras fueron sembradas en medio Loewenstein-Jensen y en Middlebrook 7H9 en el sistema bacteriológico automatizado BACTEC 320.

Para fines de este estudio las cepas previamente aisladas e identificadas fueron descongeladas y subcultivadas en medio agar chocolate para las de crecimiento rápido y en Lowenstein-Jensen para las de crecimiento lento e incubadas a 35°C con CO₂ al 5 %.

La identificación definitiva fue realizada mediante métodos moleculares usando la secuenciación de los genes *16S rRNA*, *rpoB*, *hsp65*. Las secuencias se introdujeron en GenBank para su identificación preliminar, sin embargo, en ciertos casos donde las especies están estrechamente relacionadas las secuencias no pudieron identificar definitivamente las cepas. Por lo que, todas las especies fueron sometidas a un análisis filogenético.

Se utilizó la prueba de Fisher para evaluar las diferencias en los datos de las diferentes especies de micobacterias analizadas. La significación estadística se fijó en $p < 0,05$. Los análisis se realizaron en Past4.06b (Hammer et al., 2001).

2.2. Análisis resistencia a antimicrobianos

Las muestras positivas fueron detectadas por el sistema BACTEC 960 (Becton Dickinson, EE. UU.). Las pruebas de resistencia a antibióticos, se evaluó mediante la técnica de microdilución en caldo (MIC) usando las placas del sistema Sensititre (Thermo Fisher Scientific, USA) para NTM de crecimiento lento (SLOMYCO) y NTM de crecimiento rápido (RAPIDMYCO), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Huang et al., 2020).

Los antibióticos probados para MCR fueron trimetoprima/sulfametoxazole, amikacina, claritromicina, moxifloxacino, ciprofloxacino, linezolid, doxiciclina, tigeciclina, tobramicina, imipenem, minociclina, amoxicilina/ácido clavulánico, cefepima, ceftriaxona, y para MCL fueron: trimetoprima/sulfametoxazole, amikacina, claritromicina, moxifloxacino, ciprofloxacino, linezolid, doxiciclina, etambutol, estreptomina, etionamida, isoniazida, rifabutina, y rifampicina. La interpretación se realizó según las guías del CLSI (CLSI, 2018). Muchas micobacterias no tienen puntos de corte establecidos, por lo que para algunas de ellas además del CLSI se revisó otras guías (Vega et al., 2016).

Se calculó el índice de resistencia antibacteriana (ARI) (Mohanta & Goel, 2014), para evaluar la resistencia en las diferentes especies de micobacterias identificadas. Este índice relaciona la susceptibilidad a los patógenos y el uso de antibióticos para representar el nivel general de resistencia y la eficacia de la terapia con antibióticos (Klein et al., 2019).

2.3. Extracción, amplificación y secuenciación genómica

El ADN genómico se extrajo usando el kit QIAamp DNA Minikit (QIAGEN, Hilden, Alemania), directamente de medio agar chocolate o del Lowenstein-Jensen una vez que las MNT formaron colonias visibles. Los procedimientos y reactivos se utilizaron de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ADN eluido se almacenó a -20°C hasta el análisis por PCR. Se realizó la amplificación de los genes 16S rRNA, *rpoB* y *hsp65*. Los cebadores para amplificación se pueden visualizar en la Tabla 1.

Tabla 1. Cebadores usados para amplificación de genes 16S rRNA, *rpoB* y *hsp65*

Genes	Cebadores	Secuencia	Tamaño del fragmento	Referencia
<i>hsp65</i>	TB 11	ACCAACGATGGTGTGCCT	400 pb	(Telenti et al., 1993)
	TB 12	CTTGTCGAACCGCATACC		
16S rRNA	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	1500 pb	(Heuer et al., 1997)
	1492R	TACGGYTACCTGTTACGACTT		
<i>rpoB</i>	<i>rpoB</i> -R	AGCGGCTGCTGGGTGATCATC	720 pb	(Adékambi et al., 2003)
	<i>rpoB</i> -F	GGCAAGGTCACCCCGAAGGG		

Se utilizaron las siguientes condiciones de ciclado: desnaturalización inicial de 4 min a 95°C ; 35 ciclos de 30s a 95°C , 1 min a 60°C (*hsp65*), 55°C (*rpoB*), 57°C (16S rRNA), 1 min a 72°C ; y una extensión final de 10 min a 72°C . Los productos de PCR fueron visualizados en electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % bajo luz ultravioleta.

Los productos de PCR de los tres genes fueron secuenciados por el método Sanger utilizando los mismos cebadores de amplificación, a excepción del gen 16S rRNA en los que se usaron los cebadores 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3') y 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3') para cubrir toda la región (Ghyselinck et al., 2013).

2.4 Alineamiento de secuencias y BLAST

Las secuencias producto de los cebadores directo (*forward*) e inverso (*reverse*) fueron alineadas entre sí usando el programa Sequencher 5.4.6 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA) para obtener una secuencia consenso (Edgar, 2004), rotulada con código respectivo.

Las secuencias consenso fueron alineadas y comparadas con la base de datos de NCBI o GenBank usando la herramienta de búsqueda de alineamiento local básica BLAST-n NCBI, para realizar un primer nivel de identidad o porcentaje de similitud nucleotídica y el valor de cobertura.

Se muestrearon en NCBI secuencias de micobacterias para cada marcador (16S rRNA, *rpoB* y *hsp65*) utilizando el criterio de aquellas secuencias de identidad cercana a los BLAST obtenidos con las muestras de laboratorio. Un total de 167 secuencias fueron muestreadas; de ellas 53 para 16S, 57 para *rpoB* y 57 para *hsp65*. Se incluyeron para el análisis secuencias de grupos hermanos de referencia y grupos externos como especies de *Tsukamurella*, *Gordonia* y *Nocardia* (Ledesma et al., 2022). Las secuencias de especies de *Mycobacterium* y grupos de referencia utilizadas se muestran en la Tabla 2 con sus respectivas localidades, origen de la muestra y código de acceso de GeneBank.

Tabla 2. Secuencias de especies de *Mycobacterium* y grupos de referencia con sus respectivas localidades, origen de la muestra y código de acceso de GeneBank.

Genes	Código de acceso de GeneBank	Especie	Localidad	Origen de muestra
16S	AJ508748.1	<i>Nocardia puris</i>	Alemania	absceso
	KP137526.1	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	Iran	muestra de suelo
	X81923.1	<i>Gordonia sputi</i>	Francia	ND
	AB624257.1	<i>Gordonia iterans</i>	Japón	esputo
	AB239925.1	<i>Mycobacterium kumamotoense</i>	Japón	esputo
	DQ157760.2	<i>Mycobacterium arupense</i>	USA	tendon
	KR025879.1	<i>Mycobacterium virginense</i>	USA	tendón
	GU142938.1	<i>Mycobacterium bovis</i>	Iran	biopsia hueso
	X52917.1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Alemania	ND
	AJ536035.1	<i>Mycobacterium kansasii</i>	Alemania	ND
	AJ536037.1	<i>Mycobacterium avium subsp. avium</i>	Alemania	ND
	EF521892.1	<i>Mycobacterium avium subsp. hominissuis</i>	Francia	ND
	X52927.1	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	Alemania	ND
	EU266632.1	<i>Mycobacterium marseillense</i>	Francia	ND
	X52926.1	<i>Mycobacterium szulgai</i>	Alemania	ND
	X52923.1	<i>Mycobacterium gordonae</i>	Alemania	ND
	MW331596.1	<i>Mycobacterium simiae</i>	Iran	esputo
	X55602.1	<i>Mycobacterium thermoresistibile</i>	Alemania	ND
	AF107039.2	<i>Mycobacterium monacens</i>	Alemania	ND
	GU142927.1	<i>Mycobacterium phlei</i>	Iran	lavado bronquial
	AY457083.1	<i>Mycobacterium wolinskyi</i>	Francia	ND
	X55597.1	<i>Mycobacterium obuense</i>	Alemania	ND
	HQ009482.1	<i>Mycobacterium iranicum</i>	Iran	lavado broncoalveolar
	AY457066.1	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	Francia	ND
	AY457084.1	<i>Mycobacterium farcinogenes</i>	Francia	ND
	AY457081.1	<i>Mycobacterium senegalense</i>	Francia	ND

	AF480588.1	<i>Mycobacterium porcinum</i>	Canada	ND
	AY859684.1	<i>Mycobacterium conceptionense</i>	Francia	ND
	AJ746070.2	<i>Mycobacterium llutzerense</i>	España	agua de hemodiálisis
	LC082316.1	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	Japón	ND
	AY457074	<i>Mycobacterium mucogenicum</i>	Francia	ND
	AY859682.1	<i>Mycobacterium phocaicum</i>	Francia	ND
	AF480593.1	<i>Mycobacterium neoaurum</i>	Canada	ND
	AY449728.1	<i>Mycobacterium cosmeticum</i>	USA	lesión granulomatosa subdérmica
	KY392537.1	<i>Mycobacterium aquaticum</i>	Italia	agua de hemodiálisis
	ON194490.1	<i>Mycobacterium abscessus subsp. abscessus</i>	China	ND
	AY457071.1	<i>Mycobacterium abscessus</i>	Francia	ND
	JX266694.1	<i>Mycobacterium chelonae</i>	Iran	lavado broncoalveolar
	HE654001.1	<i>Mycobacterium immunogenum</i>	Alemania	ND
	X92981.1	<i>Tsukamurella pulmonis</i>	Alemania	esputo
	Y12248.1	<i>Tsukamurella tyrosinosolvans</i>	USA	cultivo de sangre
hsp65	JF491320.1	<i>Mycobacterium monacense</i>	USA	ND
	JX154110.1	<i>Mycobacterium chelonae</i>	Mexico	ND
	MZ927076.1	<i>Mycobacterium immunogenum</i>	China	piel
	KU146534.1	<i>Mycobacterium abscessus subsp. massiliense</i>	España	pulmón
	JX154114.1	<i>Mycobacterium abscessus subsp. bolletii</i>	Mexico	ND
	OL704725.1	<i>Mycobacterium abscessus subsp. abscessus</i>	China	esputo
	AY458075.1	<i>Mycobacterium abscessus</i>	Francia	ND
	AF547849.1	<i>Mycobacterium kansasii</i>	Francia	ND
	AY299144.1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Korea del Sur	ND
	AF547803.1	<i>Mycobacterium africanum</i>	Francia	ND
	AF547813.1	<i>Mycobacterium bovis</i>	Francia	ND
	CP074075.1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	USA	ND
	AF547848.1	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	Francia	ND
	KF224991.1	<i>Mycobacterium yongonense</i>	Italia	muestra pulmonar
	EU239788.1	<i>Mycobacterium marseillense</i>	Francia	tracto respiratorio
	MW523771.1	<i>Mycobacterium avium subsp. hominissuis</i>	USA	agua potable
	AF547808.1	<i>Mycobacterium avium subsp. avium</i>	Francia	ND
	AY299137.1	<i>Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis</i>	Korea del Sur	ND
	MT433534.1	<i>Mycobacterium intracellulare subsp. chimaera</i>	USA	suelo
	AF547875.1	<i>Mycobacterium simiae</i>	Francia	ND
	AF547840.1	<i>Mycobacterium gordonae</i>	Francia	ND
	MF411147.1	<i>Mycobacterium marinum</i>	Sudafrica	animales acuáticos de granja
	AF547878.1	<i>Mycobacterium szulgai</i>	Francia	ND
	AF547880.1	<i>Mycobacterium thermoresistibile</i>	Francia	ND
	AB239920.1	<i>Mycobacterium kumamotoense</i>	Japón	ND
	MK587449.1	<i>Mycobacterium virginense</i>	Japón	heces
	EU191917.1	<i>Mycobacterium arupense</i>	Francia	ND

	AM421344.1	<i>Mycobacterium llatzerense</i>	España	agua de hemodiálisis
	AY458078.1	<i>Mycobacterium mucogenicum</i>	Francia	ND
	DQ987726.1	<i>Mycobacterium phocaicum</i>	Francia	ND
	AF547860.1	<i>Mycobacterium neoaurum</i>	Francia	ND
	AY449730.1	<i>Mycobacterium cosmeticum</i>	USA	lesión granulomatosa subdérmica
	AF547867.1	<i>Mycobacterium porcinum</i>	Francia	ND
	AY458069.1	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	Francia	ND
	AM902957.1	<i>Mycobacterium conceptionense</i>	Reino Unido	ND
	AF547830.1	<i>Mycobacterium farcinogenes</i>	Francia	ND
	AY458087.1	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	Francia	ND
	AY458072.1	<i>Mycobacterium fortuitum subsp. fortuitum</i>	Francia	ND
	KY392538.1	<i>Mycobacterium aquaticum</i>	Italia	ND
	FJ531484.1	<i>Mycobacterium wolinskyi</i>	Brasil	herida quirúrgica
	AY299158.1	<i>Mycobacterium phlei</i>	Korea del Sur	ND
	KT992221.1	<i>Mycobacterium obuense</i>	Portugal	ND
	DQ381734.2	<i>Mycobacterium iranicum</i>	Italia	ND
	KP284450.1	<i>Nocardia sp.</i>	Cuba	suelo agrícola
	AY903632.1	<i>Nocardia puris</i>	Francia	ND
	KY818059.1	<i>Nocardia beijingensis</i>	Brasil	absceso cutáneo en la cadera
	AY299155.1	<i>Mycobacterium mucogenicum</i>	Korea del Sur	ND
rpoB	AP025457.1	<i>Tsukamurella pulmonis</i>	Japón	ND
	CP001966.1	<i>Tsukamurella paurometabola</i>	USA	suelo
	CP026746.1	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	USA	ND
	CP089214.1	<i>Nocardia asteroides</i>	USA	ND
	CP059491.1	<i>Gordonia jinghuaiqii</i>	China	heces
	LC549669.1	<i>Mycobacterium marinum</i>	Japón	pez volador de cabeza afilada criado en acuario
	CP074075.1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	USA	ND
	LR699570.1	<i>Mycobacterium tuberculosis variant bovis</i>	Francia	órganos animales
	JF923622.1	<i>Mycobacterium africanum</i>	USA	ND
	KU362968.1	<i>Mycobacterium kansasii</i>	Iran	esputo
	JN881348.1	<i>Mycobacterium szulgai</i>	USA	muestra animal
	KF910171.1	<i>Mycobacterium gordonae</i>	Korea del Sur	bubón
	AP020326.1	<i>Mycobacterium avium subsp. hominissuis</i>	Japón	contenidos estomacales de un potro abortado
	EF521906.1	<i>Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis</i>	Francia	ND
	GQ153306.1	<i>Mycobacterium avium subsp. avium</i>	USA	ND
	EF584444.1	<i>Mycobacterium marseillense</i>	Francia	tracto respiratorio
	GQ153309.1	<i>Mycobacterium chimaera</i>	USA	ND
	KP401758.1	<i>Mycobacterium yongonense</i>	China	muestra de vías respiratorias

KF910215.1	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	Korea del Sur	toro
FJ418047.1	<i>Mycobacterium simiae</i>	Italia	ND
JN571260.1	<i>Mycobacterium kumamotoense</i>	Italia	ND
KR025887.1	<i>Mycobacterium virginense</i>	USA	codo
KU362995.1	<i>Mycobacterium thermoresistibile</i>	Iran	esputo
JF712875.1	<i>Mycobacterium neoaurum</i>	USA	muestra animal
JQ906698.1	<i>Mycobacterium iranicum</i>	Países Bajos	esputo
ON994958.1	<i>Mycobacterium porcinum</i>	España	tejido
JN400399.1	<i>Mycobacterium conceptionense</i>	USA	punta del catéter
JF706631.1	<i>Mycobacterium senegalense</i>	USA	muestra animal
JF712876.1	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	USA	muestra animal
KY947149.1	<i>Mycobacterium farcinogenes</i>	Iran	esputo
JF346874.1	<i>Mycobacterium fortuitum subsp. fortuitum</i>	USA	muestra animal
FJ531483.1	<i>Mycobacterium wolinskyi</i>	Brasil	herida quirúrgica
KY392539.1	<i>Mycobacterium aquaticum</i>	Italia	ND
MK105546.1	<i>Mycobacterium abscessus</i>	Iran	esputo
KT185541.1	<i>Mycobacterium abscessus subsp. abscessus</i>	España	pulmón
KF360857.1	<i>Mycobacterium abscessus subsp. bolletii</i>	USA	esputo
KU146533.1	<i>Mycobacteroides abscessus subsp. massiliense</i>	España	pulmón
KT779874.1	<i>Mycobacterium chelonae</i>	Bélgica	ND
EU109285.1	<i>Mycobacterium immunogenum</i>	Francia	ND
AY859700.1	<i>Mycobacterium phlei</i>	Francia	ND
JN571227.1	<i>Mycobacterium arupense</i>	Italia	ND
KU361327.1	<i>Mycobacterium monacense</i>	Ecuador	lesión nodular
HM807441.1	<i>Mycobacterium mucogenicum</i>	Italia	ND
AM421395.1	<i>Mycobacterium llutzerense</i>	España	agua de hemodiálisis
EU770581.1	<i>Mycobacterium phocaicum</i>	Francia	torres de enfriamiento

ND= No determinado

279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299

Se construyó una matriz de alineamiento por cada gen o marcador mediante ClustalW en MacVector software 18.2.5 con parámetros de Penalidad de Creación de Gap-GOP y Penalidad de Extensión de Gap-GEP de 30.0 y 10.0 respectivamente buscando el mayor grado de homología posicional.

2.5 Análisis Filogenéticos

Se utilizaron las respectivas matrices alineadas para la construcción de las hipótesis o árboles filogenéticos como segundo nivel de identificación, utilizando el software PAUP 4.0 (build 169) para optimización de Parsimonia Máxima (MP) y MEGAX para Máxima Verosimilitud (ML) de los genes 16S rRNA, *rpoB* y *hsp65*.

El modelo de sustitución nucleotídica de cada matriz para el análisis de ML fue calculado por Model Test bajo MEGAX calculado mediante el criterio de Akaike y Bayesian Inference Criteria (BIC). El árbol de ML fue construido con un árbol inicial de MP y el modelo respectivo para cada matriz-gen-marcaador.

La construcción de MP fue realizada con 1.000 réplicas de adición al azar de taxa y caracteres y barrido de ramas con TBR (Tree Bisection and Reconnection). Posteriormente se realizó un repesado de caracteres homólogos mediante el índice de consistencia recalculado (RCI) y se obtuvo los valores (en %) de soporte de ramas mediante 1.000 pseudoréplicas de bootstrap de la matriz como apoyo estadístico *a posteriori* de clados o ramas (Felsenstein 1985). La secuencia de los análisis está basada en trabajos previos (Ledezma et al 2021; Carrillo et al 2022, De la Cadena et al 2022 y otros). Bajo el mismo procedimiento, luego de cada construcción por separado se realizó un

análisis concatenado de los tres genes como verificación por la topología final del nivel de información de cada gen.

Como tercer nivel de verificación de identificación molecular y con fines de clasificación en complejos, grupos y verificación de especies filogenéticas (concepto de especie filogenética), se evaluó cada clado monofilético mediante la divergencia entre e intra clados mediante la construcción de matrices de distancia (y % divergencia $\times 100$) mediante el modelo de p-distancia sin corregir, así como entre secuencias obtenidas del NCBI y las obtenidas en el laboratorio.

2.6 Consideraciones éticas

Las muestras de mycobacterias provienen del cepario de la Unidad e Investigaciones en Biomedicina de Zurita&Zurita Laboratorios quien aprobó el uso de las micobacterias del cepario, y no tienen información relacionada con datos de pacientes.

3. Resultados

3.1. Población de estudio

Se recolectaron los datos de perfiles de sensibilidad, la naturaleza de la muestra clínica, tipo de crecimiento y año de recolección de todos los aislados. La mayoría de las micobacterias fueron aisladas de muestras respiratorias (31/57; 54.4%), seguida de piel y tejidos blandos (25/57; 43.8%) y una efusión (1/57; 1.8%).

En el año 2021, se recolectaron la mayoría de aislados (19/57; 33.3%), seguido del 2019 (14/57; 24.6%), 2022 (13/57; 22.8%), 2020 (6/57; 10.5%), y 2018 (5/57; 8.8%) (Tabla 3).

Tabla 3. Características fenotípicas por complejos de micobacterias aisladas, cultivadas y almacenadas

*=valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$)

Característica	<i>M. abscessus-chelonae complex</i> (35)	P-value	<i>M. intracellulare complex</i> (5)	P-value	<i>M. avium complex</i> (8)	P-value	<i>M. fortuitum complex</i> (5)	P-value	<i>M. marimum</i> (1)	P-value	
Origen de muestra	Respiratoria	18	0.3793	5	0.0586	7	0.0635	0	0.0327*	0	0.4423
	No respiratoria	17		0		1		5		1	
Año	2018	3	1	0	1	1	0.5666	1	0.397	0	1
	2019	6	0.0581	3	0.1031	3	0.4134	2	0.5954	0	1
	2020	3	0.5442	0	1	0	1	0	1	0	1
	2021	16	0.0379*	2	1	1	0.2358	0	0.1492	0	1
	2022	7	0.5061	0	0.3208	3	0.382	2	0.5837	1	0.2407

De 57 muestras, tres (3/57; 5.26%) fueron identificados como *M. tuberculosis* y 54 (94.74%) como MNT, por métodos fenotípicos. En el 29.82% (17/57) de los casos, las MNT fueron clasificadas como micobacterias de lento crecimiento (MCL) y el 70.17% (40/57) como micobacterias de rápido crecimiento (MCR).

Todas las muestras se amplificó el material genético para los genes 16s rRNA, *rpoB* y *hsp65*. Cuatro muestras (L166, L493, L365, L495) fueron excluidas del análisis filogenético para el gen 16s rRNA y del concatenado ya que se obtuvo una secuencia con múltiples picos para este gen.

3.2. Análisis resistencia a antimicrobianos

3.2.1. Análisis resistencia a antimicrobianos en MCR

Todos los aislamientos se sometieron a pruebas de susceptibilidad. La amikacina fue el fármaco más activo frente a MCR. Ningun aislado fue resistente a amikacina. Una única cepa fue resistente a tigeciclina. Para la claritromicina, el 7.5% (3/40) de MCR fueron resistentes. La tasa de resistencia a linezolid fue del 42.5%. Las tasas de resistencia a amoxicilina/ácido clavulánico, cefepima y ceftriaxona mostraron una resistencia del 100% en todos los aislamientos del grupo MCR. Las tasas de resistencia a minociclina (32/40; 80%), imipenem (25/40; 62.5%), tobramicina (27/40; 67.5%), doxiciclina (32/40; 80%), ciprofloxacina (33/40; 82.5%), moxifloxacino (20/40; 50%) y trimetoprima/sulfametoxazol (25/40; 62.5%) fueron altas para MCR (Tabla 4).

332

333

334

335

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349

Tabla 4. Perfil de susceptibilidad de micobacterias de crecimiento rápido usando el sistema Sensititre

350
351

Micobacterias de crecimiento rápido															
Cepa (n)	Susceptibilidad	Trimetoprim/sulfametoxazole n (%)	Amikacina n (%)	Clarithromicina n (%)	Moxifloxacino n (%)	Ciprofloxacino n (%)	Linezolid n (%)	Doxiciclina n (%)	Tigeciclina n (%)	Tobramicina n (%)	Imipenem n (%)	Minociclina n (%)	Amoxicilina/ácido clavulánico n (%)	Cefepime n (%)	Ceftriaxona n (%)
<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> (22)	Susceptible	11 (50%)	22 (100%)	20 (90.9%)	9 (40.9%)	0 (0%)	13 (59.1%)	1 (4.5%)	21 (95.4%)	4 (18.2%)	3 (13.6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	Resistente	11 (50%)	0 (0%)	2 (10%)	13 (59%)	22 (100%)	9 (40.9%)	21 (95.4%)	1 (4.5%)	18 (81.8%)	19 (86.4%)	22 (100%)	22 (100%)	22 (100%)	22 (100%)
<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> (5)	Susceptible	0 (0%)	5 (100%)	5 (100%)	1 (20%)	1 (20%)	3 (60%)	1 (20%)	5 (100%)	1 (20%)	1 (20%)	1 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	Resistente	5 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (80%)	4 (80%)	2 (40%)	4 (80%)	0 (0%)	4 (80%)	4 (80%)	4 (80%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> (1)	Susceptible	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	Resistente	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)
<i>Mycobacterium chelonae</i> (7)	Susceptible	0 (0%)	7 (100%)	7 (100%)	5 (71.4%)	1 (14.3%)	5 (71.4%)	3 (42.8%)	7 (100%)	7 (100%)	7 (100%)	3 (42.8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	Resistente	7 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (28.6%)	6 (85.7%)	2 (28.6%)	4 (57.1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (57.1%)	7 (100%)	7 (100%)	7 (100%)
<i>Mycobacterium conceptionenses</i> (2)	Susceptible	0 (0%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	0 (0%)	2 (100%)	2 (100%)	0 (0%)	2 (100%)	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	Resistente	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)
<i>Mycobacterium fortuitum</i> (3)	Susceptible	3 (100%)	3 (100%)	2 (66.7%)	3 (100%)	3 (100%)	2 (66.7%)	2 (66.7%)	3 (100%)	0 (0%)	2 (66.7%)	2 (66.7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	Resistente	0 (0%)	0 (0%)	1 (33.3%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (33.3%)	1 (33.3%)	0 (0%)	3 (100%)	1 (33.3%)	1 (33.3%)	3 (100%)	3 (100%)	3 (100%)

352

3.2.2. *Análisis resistencia a antimicrobianos en MCL*

No se observó resistencia a claritromicina en ningún aislado. Las tasas de resistencia a ciprofloxacino (6/17; 42.8%), linezolid (6/17; 42.8%), trimetoprim/sulfametoxazol (5/17; 35.7%), moxifloxacino (5/17; 35.7%), ethionamide (4/17; 28.6%), rifabutina (3/17; 21.4%), amikacina (2/17; 14.3%), rifampicina (2/17; 14.3%), ethambutol (2/17; 14.3%), fueron inferiores al 50% a excepción de estreptomina (7/17; 50%), isoniazida (7/17; 50%) y doxiciclina (11/17; 78.6%) (Tabla 5).

Tabla 5. Perfil de susceptibilidad de micobacterias de crecimiento lento usando el sistema Sensititre

360
361

Micobacterias de crecimiento lento

Cepa (n)	Susceptibilidad	Trimetoprim/sulfametoxazole n (%)	Amikacina n (%)	Clarithromicina n (%)	Moxifloxacino n (%)	Ciprofloxacino n (%)	Linezolid n (%)	Doxiciclina n (%)	Ethambutol n (%)	Estreptomina n (%)	Ethionamida n (%)	Isoniazida n (%)	Rifabutina n (%)	Rifampicina n (%)
<i>Mycobacterium marinum</i> (1)	Susceptible	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)
	Resistente	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>Mycobacterium avium subsp hominissuis</i> (7)	Susceptible	4 (57.1%)	6 (85.7%)	7 (100%)	3 (42.8%)	3 (42.8%)	2 (28.6%)	2 (28.6%)	5 (71.4%)	3 (42.8%)	5 (71.4%)	3 (42.8%)	6 (85.7%)	5 (71.4%)
	Resistente	3 (42.9%)	1 (14.3%)	0 (0%)	4 (57.1%)	4 (57.1%)	5 (71.4%)	5 (71.4%)	2 (28.6%)	4 (57.1%)	2 (28.6%)	4 (57.1%)	1 (14.3%)	2 (28.6%)
<i>Mycobacterium avium complex</i> (1)	Susceptible	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)
	Resistente	1 (100%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>Mycobacterium intracellulare</i> (2)	Susceptible	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	0 (0%)	2 (100%)	1 (50%)	2 (100%)	1 (50%)	2 (100%)	2 (100%)
	Resistente	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	1 (50%)	0 (0%)	1 (50%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>Mycobacterium intracellulare complex</i> (3)	Susceptible	2 (66.7%)	3 (100%)	3 (100%)	2 (66.7%)	1 (33.3%)	2 (66.7%)	0 (0%)	3 (100%)	1 (33.3%)	1 (33.3%)	1 (33.3%)	1 (33.3%)	3 (100%)
	Resistente	1 (33.3%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (33.3%)	2 (66.7%)	1 (33.3%)	3 (100%)	0 (0%)	2 (66.7%)	2 (66.7%)	2 (66.7%)	2 (66.7%)	0 (0%)

362

363

Se observó diferencias entre los dos tipos de micobacterias (MCR y MCL) en cuanto al índice ARI (0.54 vs. 0.25). Las MCR mostraron una mayor tasa de resistencia frente a las MCL. Las 3 subespecies de *M. abscessus* mostraron la mayor tasa de resistencia entre MCR en cuanto al índice ARI (0.65). Dentro del grupo de MCL las cepas pertenecientes a *M. avium* mostraron una mayor tasa de resistencia según el índice ARI (0.41). Tras el análisis del índice ARI, se obtuvo que *M. abscessus-chelone complex* mostró un valor más alto frente a las demás complejos con un valor de 0.61 (Tabla 6 y Tabla 7).

Tabla 6. Cálculo del índice de resistencia a antimicrobianos de aislados de MCL

Cepa (n)	<i>M. marinum</i> (1)	<i>M. avium</i> subsp <i>hominissuis</i> (7)	<i>M. avium</i> complex (1)	<i>M.</i> <i>intracellulare</i> (2)	<i>M. intracellulare</i> complex (3)
Trimetoprim/sulfametoxazole n (%)	0 (0%)	3 (42.8%)	1 (100%)	0 (0%)	1 (33.3%)
Amikacina n (%)	0 (0%)	1 (14.3%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Claritromicina n (%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Moxifloxacino n (%)	0 (0%)	4 (57.1%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (33.3%)
Ciprofloxacino n (%)	0 (0%)	4 (57.1%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (66.7%)
Linezolid n (%)	0 (0%)	5 (71.4%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (33.3%)
Doxiciclina n (%)	1 (100%)	5 (71.4%)	0 (0%)	2 (100%)	3 (100%)
Ethambutol n (%)	0 (0%)	2 (28.6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Estreptomina n (%)	0 (0%)	4 (57.1%)	0 (0%)	1 (50%)	2 (66.7%)
Ethionamida n (%)	0 (0%)	2 (28.6%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (66.7%)
Isoniazida n (%)	1 (100%)	4 (57.1%)	0 (0%)	1 (50%)	2 (66.7%)
Rifabutina n (%)	0 (0%)	1 (14.3%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (66.7%)
Rifampicina n (%)	0 (0%)	2 (28.6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
ARI	0.15	0.41	0.15	0.15	0.41

Tabla 7. Cálculo del índice de resistencia a antimicrobianos de aislados de MCR

Cepa (n)	<i>M.</i> <i>abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> (22)	<i>M.</i> <i>abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> (5)	<i>M.</i> <i>abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> (1)	<i>M.</i> <i>cheloneae</i> (7)	<i>M.</i> <i>conceptionense</i> (2)	<i>M. fortuitum</i> (3)
Trimetoprim/sulfametoxazole n (%)	11 (50%)	5 (100%)	0 (0%)	7 (100%)	2 (100%)	0 (0%)
Amikacina n (%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Claritromicina n (%)	2 (9.1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (33.3%)
Moxifloxacino n (%)	13 (59.1%)	4 (80%)	1 (100%)	2 (28.6%)	0 (0%)	0 (0%)
Ciprofloxacino n (%)	22 (100%)	4 (80%)	1 (100%)	6 (85.7%)	0 (0%)	0 (0%)
Linezolid n (%)	9 (40.9%)	2 (40%)	1 (100%)	2 (28.6%)	2 (100%)	1 (33.3%)
Doxiciclina n (%)	21 (95.4%)	4 (80%)	1 (100%)	4 (57.1%)	0 (0%)	1 (33.3%)
Tigeciclina n (%)	1 (4.5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Tobramicina n (%)	18 (81.8%)	4 (80%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	3 (100%)
Imipenem n (%)	19 (86.4%)	4 (80%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (33.3%)

Minociclina n (%)	22 (100%)	4 (80%)	1 (100%)	4 (57.1%)	0 (0%)	1 (33.3%)
Amoxicilina/ácido clavulánico n (%)	22 (100%)	5 (100%)	1 (100%)	7 (100%)	2 (100%)	3 (100%)
Cefepime n (%)	22 (100%)	5 (100%)	1 (100%)	7 (100%)	2 (100%)	3 (100%)
Ceftriaxona n (%)	22 (100%)	5 (100%)	1 (100%)	7 (100%)	2 (100%)	3 (100%)
ARI	0.66	0.66	0.64	0.47	0.43	0.40

3.3 Identificación molecular mediante análisis filogenéticos

Se construyeron los árboles filogenéticos de los tres genes 16s rRNA, *rpoB* y *hsp65*, primero a partir de los genes por separado y luego usando los datos concatenados a partir de un solo conjunto de datos de alineación. Todos los árboles se enraizaron usando como grupos externos las secuencias de las especies de *Nocardia*, *Gordonia* y *Tsukamurella*, formando un grupo monofilético y basal con respecto a las especies de *Mycobacterium* que se ubicaron internamente en un grupo monofilético. Las topologías y mayoría de las interrelaciones entre las especies de *Mycobacterium* fueron muy similares y consistentes en todos los árboles construido, así como los resultados de MP y ML.

3.3.1. Análisis filogenético gen 16s rRNA

Para la construcción del árbol filogenético con base en el gen 16s rRNA se utilizó una matriz de alineamiento resultante de 1400 pares de base o caracteres posicionales por 102 secuencias o taxas. El árbol resultante se muestra en la Figura 1. Se pudo observar la agrupación de los miembros del género *Mycobacterium* en cuatro clados principales. Dos de estos clados se componen de especies de crecimiento lento, mientras que los otros dos clados se componen de especies de crecimiento rápido. Dentro del clado de especies de crecimiento rápido, el subclado basal corresponde al grupo que denominamos "Fortuitum" que abarca la mayoría de las otras especies de rápido crecimiento y el subclado interno o derivado como "Abscessus-Chelonae". Las relaciones entre las especies del subclado "Fortuitum" fueron difíciles de discernir, a diferencia de los miembros del subclado "Abscessus-Chelonae" que formaron un linaje monofilético con un valor de bootstrap del 100% dentro de las otras especies de *Mycobacterium* de crecimiento rápido y comprende el linaje de ramificación más profunda entre las especies de *Mycobacterium*. Para el caso de las especies *M. phlei*, *M. thermoresistibile* y *M. monacense*, que componen las especies de crecimiento rápido y pertenecen al subclado "Fortuitum", se observó la formación de un linaje de ramificación más temprano dentro del género *Mycobacterium*.

De los dos clados de micobacterias de crecimiento lento, el subclado designado como "Tuberculosis-Avium", contiene a la mayoría de las especies de micobacterias clínicamente importantes, como son *M. tuberculosis* y *M. avium*; y el subclado "Terraе", que forma un clado hermano y derivado con el subclado "Tuberculosis-Avium".

El porcentaje de divergencia de las secuencias 16S rRNA dentro de cada subclado fue bajo, las especies del subclado "Terraе" tuvieron un valor de 1.46%, del subclado "Tuberculosis-Avium" un valor de 1.23%, del subclado "Abscessus-Chelonae" un valor de 0.93%, y del subclado "Fortuitum" un valor de 1.15%. Para el caso de complejos los porcentajes de divergencia fueron para *M. tuberculosis* complex 0.35%, *M. avium* complex 0.079%, *M. intracellulare* complex 0.20%, *M. abscessus-chelonae* complex 0.20% y *M. fortuitum* complex 0.1%.

La divergencia entre los complejos *M. tuberculosis* y *M. avium* fue del 1.80%, entre *M. tuberculosis* y *M. intracellulare* fue 2%, entre *M. avium* y *M. intracellulare* fue 0.6% y la divergencia entre los complejos de *M. abscessus-chelonae* y *M. fortuitum* fue del 3,97 %.

De las 54 muestras analizadas usando el gen 16S rRNA, únicamente tres aislados fueron identificados a nivel de especie: la muestra L572 como *M. marinum*, L535 como *M. chelonae* y L39 como *M. fortuitum*. Los demás aislamientos se identificaron a nivel de complejo o grupo, siendo la más predominante *M. abscessus-chelonae* complex.

423

424

425

426

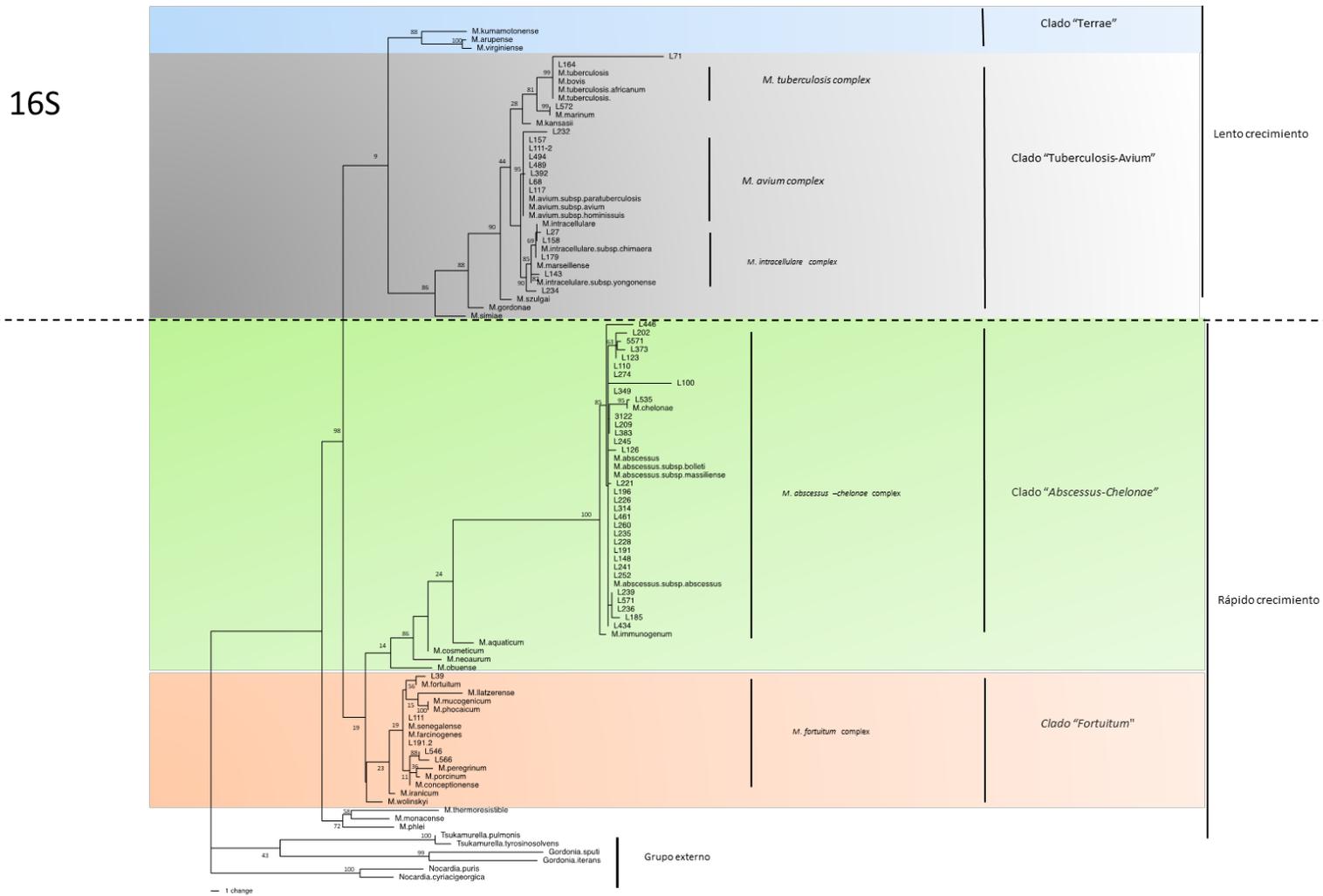


Figura 1. Análisis filogenético del gen 16s rRNA de especies de *Mycobacterium*

3.3.2. Análisis gen *rpoB*

En el caso del gen *rpoB*, se utilizó una matriz de alienamiento resultante de 720 pares de base o caracteres posicionales por 102 secuencias o taxas. Esta región no mostró la misma topología que la de un árbol construido a partir del gen 16S rRNA tras el análisis filogenético. El árbol basado en el gen *rpoB* de micobacterias se muestra en la Figura 2.

En la topología de *rpoB*, *Mycobacterium* se muestra como un clado monofilético con respecto a los grupos de referencia. Se observó la formación de dos grupos monofiléticos claramente diferenciados. El grupo A formado por las especies pertenecientes a los complejos *M. tuberculosis*, *M. avium-intracellulare* y *M. fortuitum* y el grupo B formado por las especies del complejo *M. abscessus-chelonae*, que presenta una ramificación más temprana dentro del género *Mycobacterium*. Esta distribución de las especies podría estar relacionada con la susceptibilidad a los antibióticos, así las especies pertenecientes a *M. abscessus-chelonae* complex con un valor más alto ARI forman un clado separado con respecto a las otras especies de micobacterias (Figura 2).

El gen *rpoB* no logró diferenciar entre subespecies o variantes de los diferentes complejos, a excepción del complejo *M. abscessus* en el cual se logró diferenciar claramente *M. chelonae* de *M. abscessus*, pero no se logró la diferenciación entre las subespecies del complejo *M. abscessus* agrupando a *M. bolletii* y *M. massiliense* como *M. bolletii/massiliense*, únicamente *M. abscessus subsp. abscessus* formó un grupo monofilético con un bootstrap de 100% con los aislados relacionados.

Para el gen *rpoB*, el porcentaje de divergencia de las especies dentro de los complejos para *M. tuberculosis* tuvieron un valor de 1.54%, *M. avium* un valor de 0.33%, *M. intracellulare* un valor de 0.80%, *M. abscessus-chelonae* un valor de 2.76% y *M. fortuitum* un valor de 3.20%.

La divergencia entre los complejos *M. tuberculosis* y *M. avium* fue del 14.89%, entre *M. tuberculosis* y *M. intracellulare* fue 14.61%, entre *M. avium* y *M. intracellulare* fue 5.6%, y la divergencia entre los complejos de *M. abscessus-chelonae* y *M. fortuitum* fue del 12.28%.

De los 57 aislados clínicos se logró identificar 39 aislados a nivel de especie: 28 aislamientos se identificaron como *M. abscessus*, de los cuales 22 fueron identificados a nivel del subespecie como *M. abscessus subsp. abscessus*; siete aislados como *M. chelonae*; tres como *M. fortuitum*; y uno como *M. marinum*, los demás fueron únicamente identificados a nivel de complejo o grupo.

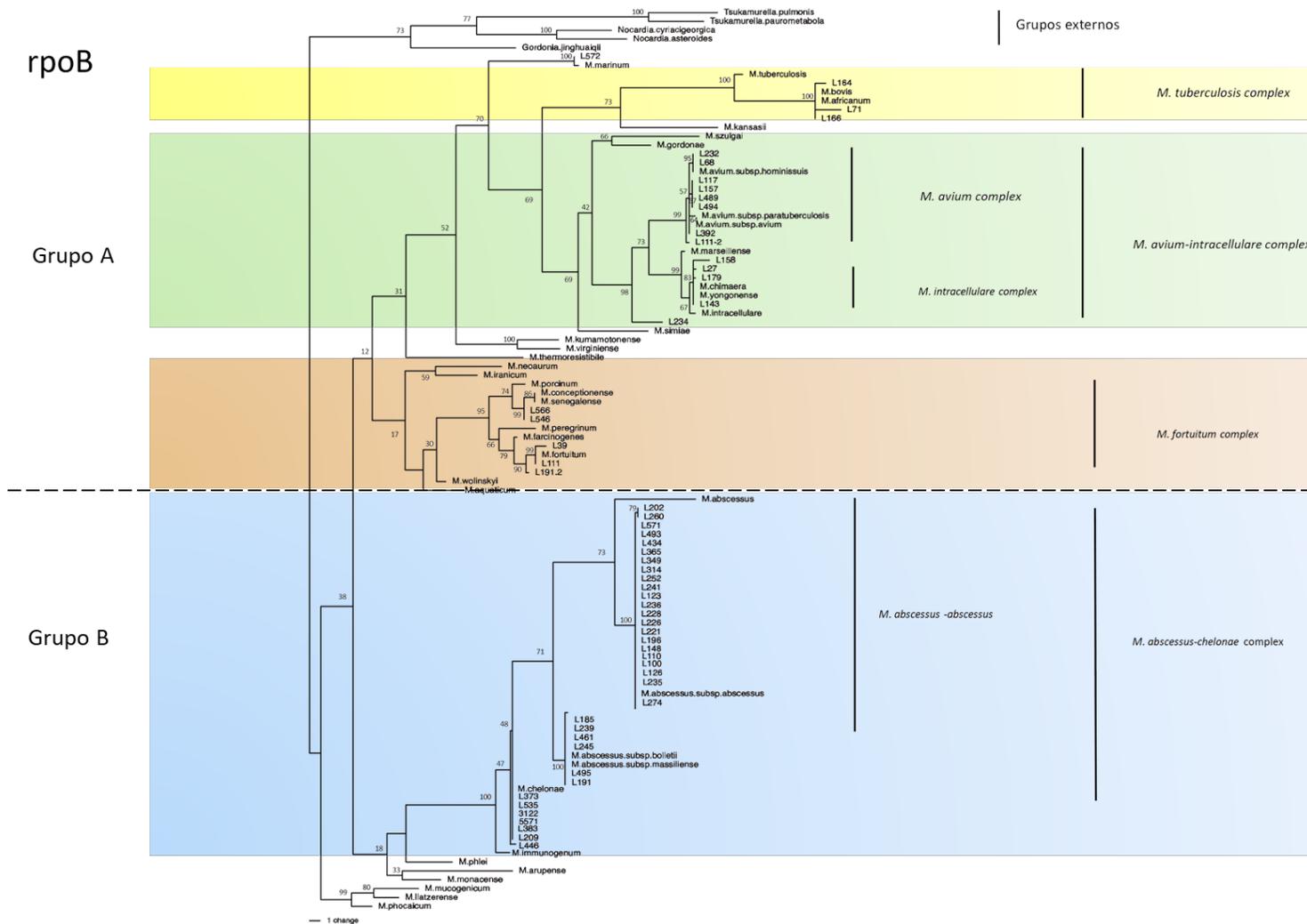


Figura 2. Análisis filogenético del gen *rpoB* de especies de *Mycobacterium*

3.3.3. Análisis gen *hsp65*

Por último se realizó el análisis con el gen *hsp65*, se utilizó una matriz de alineamiento resultante de 400 pares de base o caracteres posicionales por 105 secuencias o taxas. Se puede visualizar la formación de dos grupos claramente definidos aquellos pertenecientes al complejo *M. abscessus-chelonae*, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, y el segundo grupo formado por el complejo *M. fortuitum* que presenta una ramificación más basal. Tras el análisis estadístico de las características demográficas, se identificó que la diferenciación de clados podría estar relacionada con el tipo de muestra, obteniéndose que las especies pertenecientes al primer clado se aíslan con mayor frecuencia de muestras respiratorias, mientras que aquellas del segundo clado se aíslan principalmente de muestras no respiratorias ($p=0.0157$) (Tabla 8).

Tabla 8. Análisis estadístico para el gen *hsp65* según el origen de la muestra

gen	Origen de la muestra	Primer clado	Segundo clado	p-value
<i>hsp65</i>	Respiratoria	29	0	0.0157*
	No respiratoria	19	4	

*=valores estadísticamente significativos ($p<0.05$)

Para el gen *hsp65*, el porcentaje de divergencia de las especies dentro de los complejos para *M. tuberculosis* tuvieron un valor de 1.68%, *M. avium* un valor de 0.11%, *M. intracellulare* un valor de 1.10%, *M. abscessus-chelonae* un valor de 2.98% y *M. fortuitum* un valor de 2.10%.

La divergencia entre los complejos *M. tuberculosis* y *M. avium* fue del 7.02%, entre *M. tuberculosis* y *M. intracellulare* fue 7.46%, entre *M. avium* y *M. intracellulare* fue 4.16% y la divergencia entre los complejos de *M. abscessus-chelonae* y *M. fortuitum* fue del 6.90%.

El gen *hsp65* fue el único que logró diferenciar especies y subespecies de los diferentes complejos de *Mycobacterium sp.* Treinta y cinco (61.4%) aislamientos eran especies del complejo *M. abscessus complex*, siendo *M. abscessus subsp. abscessus* la más predominante de las subespecies con 22 aislamientos (62.8%), seguida de *M. abscessus subsp. massiliense* con 5 aislamientos (14.3%) y *M. abscessus subsp. bolletii* con 1 aislamiento (2.8%). Siete (20%) aislamientos eran del grupo *M. chelonae*. Se identificó 3 aislamientos en el complejo *M. tuberculosis* pero no logró diferenciar a sus especies individuales. En el caso de *M. intracellulare complex*, únicamente dos aislamientos se diferenciaron como *M. intracellulare*, los otros 3 aislamientos se lograron indentificar únicamente a nivel de complejo. Para el caso de *M. avium complex*, únicamente la subespecie *M. avium subsp. hominissuis* se diferenció entre las demás subespecies formando una ramificación con 7 aislamientos con bootstrap de 86%. Un aislamiento no se logró diferencia más allá del nivel de complejo *M. avium*. Para *M. fortuitum complex* se logró diferenciar entre especies de este complejo, obteniéndose 2 aislamientos pertenecientes a la especie *M. conceptionense* y 3 aislamientos a *M. fortuitum*. Además se identificó 1 aislamiento como *M. marinum*.

Hsp65 new filograma

Grupo A

Grupo B

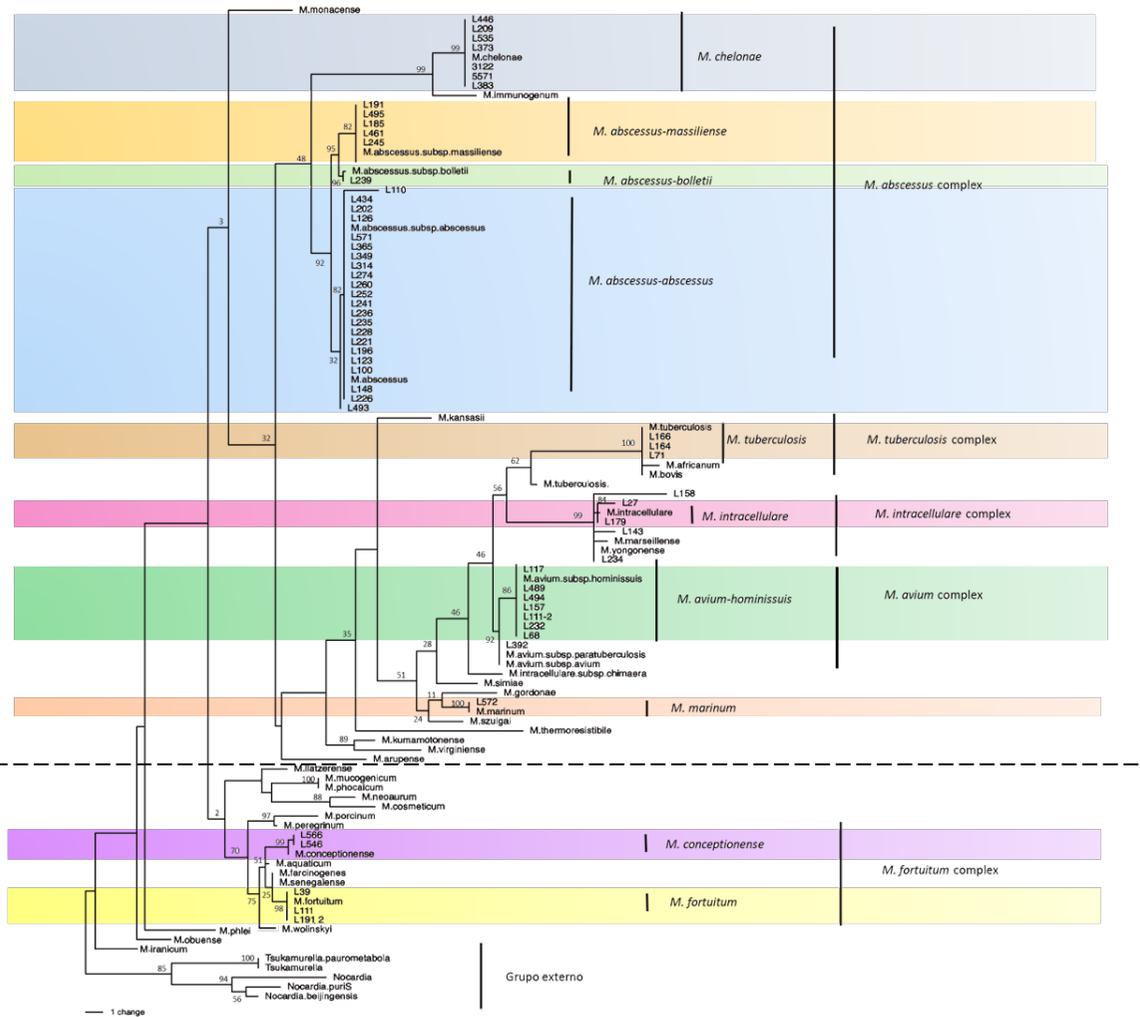


Figura 3. Análisis filogenético del gen *hsp65* de especies de *Mycobacterium*

3.3.4. Análisis de los genes concatenados

Se construyó otro árbol filogenético basado en secuencias concatenadas de los 3 genes analizados, logrando una mejor distribución de las especies, incluido aquellas pertenecientes al clado "Fortuitum", que no se logró con el análisis de los 3 genes individuales. No se pudo diferenciar entre las subespecies *M. bolleti* y *M. massillense*. Tampoco se logró una diferenciación clara de las especies pertenecientes a los complejos *M. tuberculosis* y *M. avium*. La topología fue similar a la del árbol filogenético obtenido con el gen *rpoB*.

La divergencia de secuencia dentro de cada complejo fue de 1.09% para *M. tuberculosis*, 0.15% para *M. avium*, 0.62% para *M. intracellulare*, 1.29% para *M. abscessus-chelonae* y 2.26% para *M. fortuitum*. La divergencia entre los complejos de *M. tuberculosis* y *M. avium* fue del 5.72%, entre *M. tuberculosis* y *M. intracellulare* fue 5.87%, entre *M. avium* y *M. intracellulare* fue 2.37%. Por último, la divergencia entre los complejos de *M. abscessus-chelonae* y *M. fortuitum* fue del 6.4%.

Con el análisis concatenado se identificó a nivel de especie *M. chelonae* con 7 aislamientos con un bootstrap de 78%, *M. fortuitum* con 3 aislamientos con un bootstrap de 58%, *M. conceptionense* con 2 aislados con un bootstrap de 96%, *M. abscessus subs. abscessus* con un bootstrap de 70%, *M. marinum* con 1 aislamiento con un bootstrap del 100% y *M. intracellulare* con 3 aislamientos con bootstrap de 91%.

En comparación con los 3 genes analizados, el método de tipificación *hsp65* tuvo mejor coincidencia de identificación a nivel de especies y subespecies, mientras que el análisis concatenado mostró una mejor topología.

Árbol
 Concatenado
 16S+rpoB+Hsp65

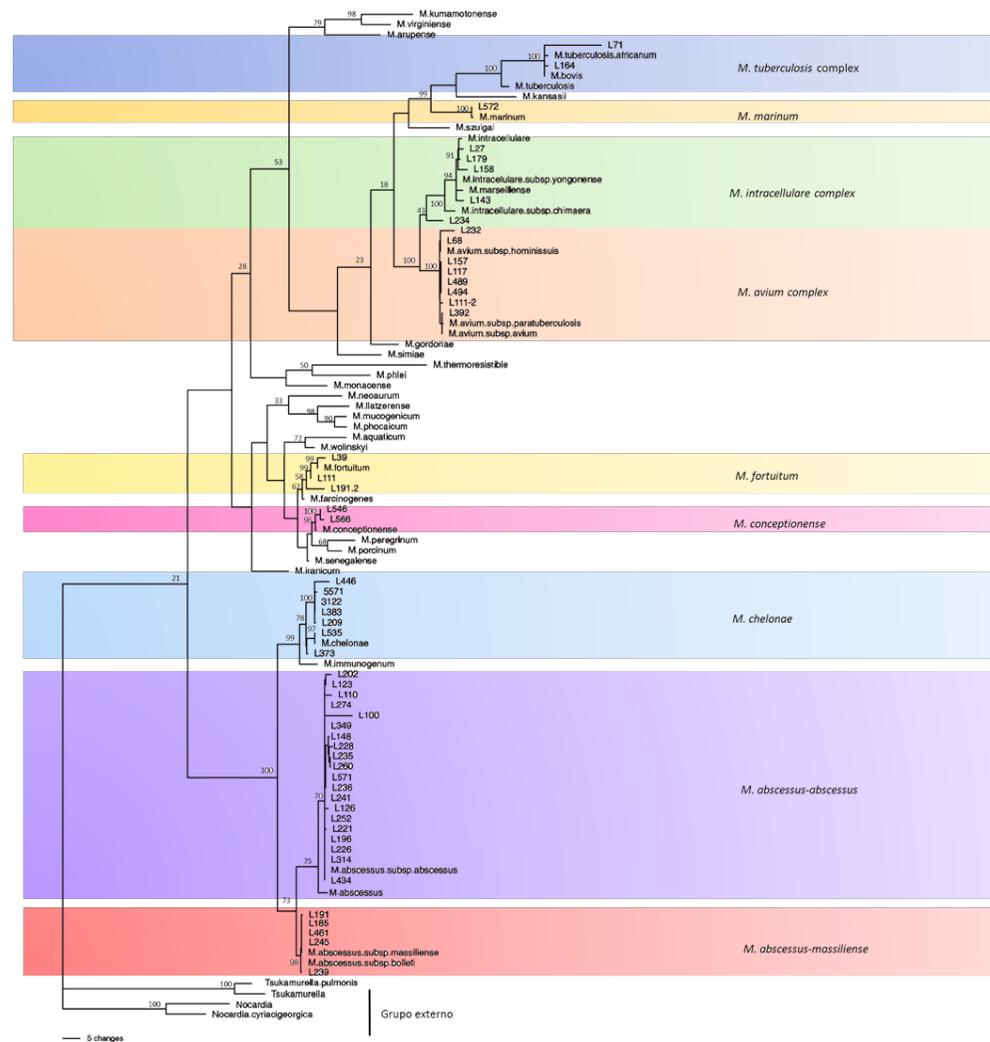


Figura 4. Análisis filogenético concatenado de especies de *Mycobacterium*

3.4. Análisis de las especies de *Mycobacterium no tuberculosis*

Este estudio identificó a 35 (64,8%) *Mycobacterium abscessus* complex siendo el grupo más prevalente. Dentro de este complejo se identificaron *Mycobacterium abscessus subsp. abscessus* (n = 22), *Mycobacterium abscessus subsp. massiliense* (n = 5), *Mycobacterium abscessus subsp. bolletii* (n =1). Se identificaron siete *Mycobacterium chelonae* (12.9%), siete (12.9%) *Mycobacterium avium subsp hominissuis*, tres (5.5%) *Mycobacterium fortuitum*, dos (3.7%) *Mycobacterium intracellulare*, dos (3.7%) *Mycobacterium conceptionenses*, una (1.8%) *Mycobacterium marinum*. Cuatro aislados que fueron identificadas únicamente a nivel de complejo una (1.8%) *Mycobacterium avium complex* y tres (5.5%) *Mycobacterium intracellulare complex*.

514

515

516

517

518

519

520

521

522

4. Discusión

La incidencia de infecciones por MNT en muestras clínicas ha aumentado en varias regiones del mundo, por lo que el diagnóstico inmediato y la identificación clara y precisa de especies de MNT causantes de la enfermedad se ha convertido en una necesidad (Sharma & Upadhyay, 2020). En Ecuador, se desconoce la incidencia de micobacterias atípicas en muestras clínicas y los únicos datos disponibles son reportes de casos de algunas especies entre ellas *M. scrofulaceum* (Nasre-Nasser & Muñoz-López, 2018), *M. terrae* (Palacios Vargas, 2021), *M. abscessus subsp. abscessus* (Moreno-Izquierdo et al., 2020), *M. timonense* (Zurita et al., 2014) y *M. monacense* (Romero et al., 2016). Por lo tanto, el presente estudio propone una vía para identificar de manera precisa las micobacterias y determinar la diversidad de especies aisladas de muestras clínicas en Ecuador.

Las técnicas moleculares han permitido una identificación precisa, rápida y confiable de las especies de micobacterias, siendo las técnicas de secuenciación de genomas completos las gold estándar para la identificación de MNT (Dohál et al., 2021). Sin embargo estas técnicas son costosas y requiere experiencia, por lo que no está disponible en los laboratorio de rutina en países con recursos limitados (Kwon et al., 2019). La secuenciación de regiones altamente conservados e hipervariables como son 16S rRNA, *rpoB* y *hsp65*, cuyos tamaños son aproximadamente 1500, 3500 y 1600 pb, respectivamente, han sido más extendidas y ampliamente utilizadas a nivel diagnóstico (S. H. Kim & Shin, 2018). En varios estudios se ha optado por seleccionar regiones parciales dentro de estos genes que cumplan con las características de ser altamente conservadas y con suficiente variabilidad intraespecie, logrando identificar los organismos de forma precisa y reduciendo los costos. En nuestro estudio analizamos el gen 16S rRNA en su totalidad (1500 pb), mientras que para el gen *hsp65* se analizó una región de 400 pb (Telenti et al., 1993) y para el gen *rpoB* una región de 720 pb (Adékambi et al., 2003).

El análisis filogenético de 16S rRNA, *rpoB* y *hsp65*, en general mostró árboles que son topológicamente similares. Para el caso del árbol 16S rRNA, los clados que abarcan la mayoría de las micobacterias de crecimiento lento se lograron diferenciar claramente de las especies de crecimiento rápido. Esta diferenciación es evidente debido a la inserción de 12 a 14 nucleótidos en las secuencias de 16S rRNA en MCL, que a menudo se usan como marcador para diferenciar entre MCR y MCL (Gupta et al., 2018). En el análisis realizado en este estudio se observó una inserción de 12 nucleótidos en las micobacterias de lento crecimiento pertenecientes al subclado "Tuberculosis", y una inserción de 14 nucleótidos pertenecientes a micobacterias del subclado "Terraes" (Figura 1).

En cuanto al análisis filogenético del gen *rpoB*, el complejo *M. abscessus-chelonae* se separó del complejo *M. fortuitum* formando un clado separado, esta diferenciación puede estar relacionada con las características de resistencia. Siendo los miembros del complejo *M. abscessus-chelonae*, pertenecientes al grupo B, las bacterias con mayores tasas de resistencia en comparación con las micobacterias agrupadas con el grupo A (Brown-Elliott & Wallace, 2002; Lee et al., 2015) (Figura 2). Los análisis estadísticos de perfiles de resistencia a antimicrobianos mostraron que los miembros del complejo *M. abscessus-chelonae*, presentaron el mayor índice ARI (0.61) con respecto a las demás especies. Este fenotipo generalmente se ha atribuido impermeabilidad de la envoltura micobacteriana, siendo la pared celular de las *M. abscessus* y *M. chelonae* de 10 a 20 veces menos permeable que las demás micobacterias, debido al mayor contenido de lípidos, lo que coincide con que *M. abscessus-chelonae* complex sean la más resistente a los antibióticos (Ganapathy et al., 2019).

El gen *rpoB* contienen información útil adicional relacionada con la susceptibilidad a la rifampicina de una especie (o cepa) particularmente de micobacterias (Bum Joon Kim et al., 1999). La resistencia a RIF se asocia en gran medida con mutaciones en un fragmento de 81 pb del gen *rpoB*, además de otros mecanismos como la menor permeabilidad de la pared celular o una bomba de expulsión mejorada (Saxena et al., 2021). Las MCR cuyos representantes más comunes son *M. abscessus* (Chopra et al., 2011) y *M. fortuitum* (Woodley et al., 1972), presentan resistencia intrínseca a la rifampicina, mientras que las MCL como el caso de *M.*

tuberculosis pueden presentar resistencia adquirida mediada por mutaciones en el gen *rpoB* o por la presencia de una bomba de expulsión mejorada (Sha et al., 2003). La resistencia en *M. abscessus* a la rifampicina se atribuye a su pared celular única compuesta por un mayor contenido de lípidos y a la presencia de ADP-ribosiltransferasas, a diferencia del resto de micobacterias cuyo principal mecanismo de resistencia son las mutaciones en el gen *rpoB* (Lambert, 2002). A pesar de que *M. fortuitum* se encuentra dentro del grupo de las MCR, para el caso de rifampicina se demostró que las mutaciones en el gen *rpoB* son las responsables de la alta tasa de resistencia al igual que en *M. tuberculosis* (Gillespie et al., 2005), la presencia de mecanismos de resistencia similares hace que *M. fortuitum* sea considerado un sustituto útil de *M. tuberculosis* en estudios de pruebas de susceptibilidad (Gillespie et al., 2005). Esta diferencia en el fenotipado de resistencia podría estar relacionado con la clara separación observada en el análisis filogenético.

La divergencia en el análisis filogenético de *rpoB* podría, además estar relacionada con el contenido de G+C% en las especies de micobacterias. Se conoce que el gen *rpoB* permite una estimación eficiente del contenido de G+C% bacteriano (Adékambi et al., 2009), por lo tanto las especies que se encuentran en el grupo A, correspondientes a los complejos *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. fortuitum*, que presentan mayores contenidos de G+C%, con valores de 65.6%, 69.1%, 68% (Cuevas-Córdoba et al., 2021) y 66% (Ho et al., 2012), respectivamente, formaron un grupo monofilético claramente diferenciado de los miembros de las especies del grupo B correspondientes al complejo *M. abscessus-chelonae* que presentan los valores más bajos de G+C%, con un valor de 64.2% (Sassi & Drancourt, 2014).

Por último, el árbol del gen *hsp65* mostró una agrupación de las especies de los complejos *M. abscessus-chelonae*, *M. tuberculosis*, *M. intracellulare* y *M. avium* un solo clado separado de los miembros del complejo *M. fortuitum*. Esta topología estructurada entre clados podría estar relacionada con el tipo u origen de la muestra, que tras el análisis estadístico mostró una diferencia estadísticamente significativa de los clados vs tipo de muestra ($p=0.0157$), sugiriendo que existe una mayor prevalencia de especies aisladas de muestras respiratorias en el clado A en contraste con el clado B. Las especies del complejo *M. abscessus-chelonae* se han aislado con más frecuencia de infecciones respiratorias característica que comparte con las micobacterias de lento crecimiento, a diferencia de *M. fortuitum*, que produce una amplia variedad de enfermedades extrapulmonares, siendo el 60% de los casos infecciones cutáneas (Brown-Elliott & Wallace, 2002). Se ha establecido que tres especies son las que componen la gran mayoría de las infecciones pulmonares por micobacterias atípicas; estas son: *M. avium*, *M. kansasii* y *M. abscessus* (Winburn & Sharman, 2022), similar a los resultados obtenidos en nuestro análisis.

El gen *hsp65* además es un factor de virulencia proteico, considerado como un importante elemento controlador de la latencia de micobacterias (Sakai et al., 1999). Por lo tanto, la divergencia en el análisis filogenético de *hsp65* podría reflejar el potencial patógeno de los miembros del género *Mycobacterium*, dividiendo a las micobacterias más patógenas en el grupo A y a la menos patógenas en el grupo B, se conoce que las especies de crecimiento lento son las más patógenas, siendo *M. tuberculosis* y *M. leprae* las principales representantes, en comparación con las especies de rápido crecimiento, a excepción de *M. abscessus* que debido a su amplia colección de factores de virulencia se asemejan a las especies de lento crecimiento (Ferrell et al., 2022). Un estudio previo realizó una comparación entre las enfermedades pulmonares producidas por *M. abscessus* y *M. avium* destacando similitudes en cuanto a su patogenicidad (Brown-Elliott & Wallace, 2002). Adicionalmente, se ha establecido que *M. abscessus* a nivel celular imita los rasgos fenotípicos de las micobacterias de lento crecimiento patógenas, como su capacidad de sobrevivir y replicarse dentro de los macrófagos, función que no es compartida por *M. fortuitum*, que son incapaces de multiplicarse dentro de macrófagos y se eliminan rápidamente de las células infectadas (Roux et al., 2016)

Los análisis filogenéticos arrojan la identificación molecular de nueve especies usando como marcadores moleculares los genes 16S rRNA, *rpoB* y *hsp65*, siendo la especie más prevalente *M. abscessus subsp. abscessus*, seguida de *M. chelonae* y *M. avium subsp. hominissuis*. No todos los marcadores moleculares lograron llegar a una identificación a nivel de especie, similar al resultado reportado por Ledesma et al., 2022 (Ledesma et al., 2022). El gen *hsp65* arrojó resultados óptimos en cuanto a la identificación de especies y subespecies.

A pesar de que gen 16S rRNA se usa comúnmente para la identificación bacteriana y cuenta con una gran cantidad de información en la base de datos del NCBI (Clarridge, 2004), para el caso de las MNT, las secuencias presentan poca variación interespecífica, por lo que es posible que no distinga especies estrechamente relacionadas (Ledesma et al., 2022), siendo la secuenciación de la región 16S rRNA, por sí sola insuficiente (Zhou et al., 2019). En nuestro estudio, únicamente tres aislamientos fueron identificados a nivel de especie usando el gen 16S rRNA, *M. marinum*, *M. chelonae*, y *M. fortuitum*.

En este estudio, el porcentaje de divergencia entre los complejos *M. abscessus-chelonae*, *M. tuberculosis* y *M. bovis*, *M. fortuitum* fue más bajo usando el gen 16S rRNA en comparación con *rpoB* y *hsp65*, lo que corrobora la dificultad distinguir las especies utilizando únicamente secuencias de 16S rRNA. Los miembros de estos complejos pudieron distinguirse de mejor manera con el análisis de los genes *hps65* y *rpoB*.

El gen *rpoB*, que codifica la subunidad b de la polimerasa de ARN, ha surgido como un gen candidato para los análisis filogenéticos y la identificación de bacterias, especialmente cuando se estudian cepas estrechamente relacionados (Adékambi et al., 2009). Varios estudios han indicado que la región hipervariable del gen *rpoB*, ubicada entre las posiciones 2300 y 3300, es la más adecuada para la identificación y discriminación filogenética a nivel de especies y subespecies (Adékambi et al., 2009). En nuestro estudio, 39 aislados fueron identificados a nivel de especie, 7 aislados como *M. chelonae*, 3 como *M. fortuitum*, 1 como *M. marinum* y 28 fueron identificados como *M. abscessus*, de los cuales 22 fueron identificados a nivel del subespecie como *M. abscessus subsp. abscessus*.

Para el caso de las subespecies *M. abscessus*, *M. bolletii* y *M. massiliense* que son especies que están estrechamente relacionadas la región *rpoB* por sí sola no fue suficiente para una buena discriminación (Zelazny et al., 2009). Encontrando valores de divergencia de 0.0% entre las subespecies *M. bolletii* y *M. massiliense* y de 2.03% entre *M. abscessus* y *M. bolletii*, *M. massiliense*. Los valores de divergencia entre grupos <2% en las secuencias *rpoB* indican que estos grupos pertenecen a la misma especie (Adékambi et al., 2006). Esto fue más marcado para *M. massiliense* y *M. bolletii*, que para *M. abscessus*. Las secuencias de *rpoB* en las cepas de los grupos *M. massiliense* y *M. bolletii* no presentaron divergencia. Por tanto, según el criterio de Adékambi et al., *M. massiliense* y *M. bolletii* para este análisis no constituyen especies diferentes (Adékambi et al., 2006). La importancia de identificar correctamente las subespecies de *M. abscessus* radica en su perfil antimicrobiano. Se conoce que *M. abscessus* y *M. bolletii* presentan resistencia inducible a macrólidos por presencia del gen *erm(41)* funcional, mientras que *M. massiliense* es susceptible debido a que este gen está truncado y no es funcional (Borek et al., 2022). Por lo tanto, la identificación correcta de las subespecies de *M. abscessus* es de relevancia clínica.

El gen *hsp65* constituye una buena opción para identificación de MCR, debido a que muestra más variabilidad que los genes 16S rRNA y *rpoB* (Ringuet et al., 1999). En este estudio se logró identificar las subespecies de *M. abscessus* mediante el análisis del gen *hsp65*, obteniendo un porcentaje de divergencia de 0.64% entre las subespecies *M. bolletii* y *M. massiliense*, 1.28% entre *M. abscessus* y *M. massiliense* y de 1.41% entre *M. abscessus* y *M. bolletii*. Este gen es parte de la familia de proteínas de choque térmico de 60 kDa y ha sido considerado como un marcador filogenético útil en varios géneros de bacterias, debido a sus estructuras primarias altamente conservadas (Chang et al., 2003). La presencia de una sola copia del gen en el genoma, significa que no se transfiere fácilmente de una bacteria a otra a diferencia del gen *rpoB* (Byoung Jun Kim et al., 2013), por lo tanto es adecuado para estudios filogenéticos de especies o de cepas estrechamente relacionadas (H. Kim et al., 2005). El análisis a partir del gen *hsp65*, logró identificar 53 aislados a nivel de especie, siete pertenecientes a *M. chelonae*, 28 a *M. abscessus* (22 a *M. abscessus*; cinco a *M. massiliense*; uno a *M. bolletii*), tres a *M. tuberculosis*, dos a *M. intracellulare*, siete a *M. avium-hominissuis*, uno a *M. marinum*, dos *M. conceptionense* y tres *M. fortuitum*.

El posicionamiento parafilético parcial (en marcadores) de algunas especies de crecimiento rápido pertenecientes al subclado "Fortuitum" y al subclado "Terrae", presentes en el árbol basado en 16S rRNA, *rpoB* y *hsp65* se resolvieron en el árbol construido con secuencias de nucleótidos concatenadas, por lo tanto, la disponibilidad cada vez mayor de marcadores que abarquen todo el genoma bacteriano, permite la construcción de árboles filogenéticos más robustos, logrando así comprender de forma fiable las relaciones

dentro del género *Mycobacterium* (Gupta et al., 2018). El análisis concatenado mostró una mejor topología, y logró la identificación de la mayoría de aislados a nivel de especie y de subespecies, a excepción de dos aislamientos que solo se lograron identificar a nivel de complejo, similar a los análisis realizados en otros estudios con genomas completos. Por lo tanto, una mayor cantidad de información genómica permite establecer mejores relaciones evolutivas, la demarcación de los diferentes taxones y por lo tanto, la comprensión de las interrelaciones entre estas especies de micobacterias (Gupta, 2014).

5. Conclusiones

Los caracteres sinapomórficos (homologías posicionales compartidos de un ancestro inmediato común) para la identificación y demarcación confiable de diferentes clados monofiléticos de las micobacterias variaron entre genes analizados, observándose una correlación entre el gen *hsp65* con los fenotipos de patogenicidad y el tipo de muestras, *rpoB* con el perfil de resistencia, el contenido de G-C%, y 16S rRNA con la tasa de crecimiento.

El gen 16S rRNA fue más conservado y presentó menor variabilidad en comparación con los genes *rpoB* y *hsp65*. El gen *hsp65* y *rpoB* presentó una mayor variabilidad por lo que permitió una aproximación óptima de identificación a nivel de especies e incluso a nivel de subespecies como el caso del gen *hsp65*. Estos resultados filogenéticos enfatizan que se deben aplicar marcadores moleculares distintos del gen 16S rRNA para obtener un esquema filogenético y evolutivo preciso, y análisis concatenados de los genes con mayor información filogenética a niveles específicos.

Las muestras clínicas mostraron homología filogenética con los grupos de *M. abscessus* (*Mycobacterium abscessus subsp. abscessus*, *Mycobacterium abscessus subsp. massiliense*, *Mycobacterium abscessus subsp. bolletii*), *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. avium* (*Mycobacterium avium subsp. hominissuis*), *M. fortuitum*, *M. intracellulare* y *M. marinum*.

Contribución de los Autores: Para artículos de investigación con varios autores, se debe proporcionar un breve párrafo que especifique sus contribuciones individuales. Las siguientes afirmaciones deben usarse: “Conceptualización, JCN. y GS.; metodología, JCN.; software, X.X.; validación, JCN., GS. y JZ.; análisis formal, GS y, JCN.; recursos, JCN y JZ.; curaduría de data, GS.; escritura—preparación de borrador o draft original, GS.; escritura—revisión y edición, GS y JCN.; visualización final, JCN.; supervisión, JCN y JZ.; administración y gestión de proyecto, JZ y JCN.; adquisición de fondos, JZ y JCN. “Todos los autores han leído y están de acuerdo con la versión final del manuscrito.”

Financiamiento/Fondos: “Esta investigación fue financiada por la DII-UISEK-P011617_(JCN) y por la Unidad de Investigaciones en Biomedicina de Zurita & Zurita Laboratorios”.

Agradecimientos: Al área de Microbiología de Zurita & Zurita Laboratorios.

Conflictos de Interés: Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Referencias citadas

- Adékambi, T., Berger, P., Raoult, D., & Drancourt, M. (2006). *rpoB* gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(Pt 1), 133–143. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.63969-0>
- Adékambi, T., Colson, P., & Drancourt, M. (2003). *rpoB*-Based Identification of Nonpigmented and Late-Pigmenting Rapidly Growing Mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 5699–5708. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.12.5699-5708.2003>
- Adékambi, T., Drancourt, M., & Raoult, D. (2009). The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends in Microbiology*, 17(1), 37–45. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2008.09.008>

- Boor, K. J., Duncan, M. L., & Price, C. W. (1995). Genetic and transcriptional organization of the region encoding the beta subunit of *Bacillus subtilis* RNA polymerase. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(35), 20329–20336. <https://doi.org/10.1074/JBC.270.35.20329>
- Borek, A., Zabost, A., Głogowska, A., Filipczak, D., & Augustynowicz-Kopec, E. (2022). New RAPMYCOI Sensititre™ Antimicrobial Susceptibility Test for Atypical Rapidly Growing Mycobacteria (RGM). *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 12(8). <https://doi.org/10.3390/DIAGNOSTICS12081976>
- Brown-Elliott, B. A., & Wallace, R. J. (2002). Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(4), 716–746. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.4.716-746.2002>
- Buele Chica, D. C. (2021). *Caracterización de genes de resistencia en micobacterias atípicas aisladas en el centro de investigación microbiológica (CIM) en el periodo 2014 - 2019*. <http://localhost:8080/xmlui/handle/123456789/4471>
- Chang, Y. H., Shangkuan, Y. H., Lin, H. C., & Liu, H. W. (2003). PCR assay of the groEL gene for detection and differentiation of *Bacillus cereus* group cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 4502–4510. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4502-4510.2003/ASSET/1E3C04EC-4781-4176-9C51-24BE595EF4E4/ASSETS/GRAPHIC/AM083202601B.JPG>
- Chopra, S., Matsuyama, K., Hutson, C., & Madrid, P. (2011). Identification of antimicrobial activity among FDA-approved drugs for combating *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(7), 1533–1536. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKR154>
- Clarridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 840. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004>
- CLSI. (2018). Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes. In 3rd ed. *CLSI document M24-A2*. Clinical and Laboratory Standards Institute. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544374/>
- Cuevas-Córdoba, B., Fresno, C., Haase-Hernández, J. I., Barbosa-Amezcuca, M., Mata-Rocha, M., Muñoz-Torrico, M., Salazar-Lezama, M. A., Martínez-Orozco, J. A., Narváez-Díaz, L. A., Salas-Hernández, J., González-Covarrubias, V., & Soberón, X. (2021). A bioinformatics pipeline for *Mycobacterium tuberculosis* sequencing that cleans contaminant reads from sputum samples. *PLOS ONE*, 16(10), e0258774. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0258774>
- Devulder, G., de Montclos, M. P., & Flandrois, J. P. (2005). A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(Pt 1), 293–302. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.63222-0>
- Dohál, M., Porvazník, I., Solovič, I., & Mokřý, J. (2021). Whole Genome Sequencing in the Management of Non-Tuberculous Mycobacterial Infections. *Microorganisms*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9112237>
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKH340>
- Eisenstadt, J., & Hall, G. S. (1995). Microbiology and classification of mycobacteria. *Clinics in Dermatology*, 13(3), 197–206. [https://doi.org/10.1016/0738-081X\(95\)00021-7](https://doi.org/10.1016/0738-081X(95)00021-7)
- Faria, S., Joao, I., & Jordao, L. (2015). General Overview on Nontuberculous Mycobacteria, Biofilms, and Human Infection. *Journal of Pathogens*, 2015, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2015/809014>
- Ferrell, K. C., Johansen, M. D., Triccas, J. A., & Counoupas, C. (2022). Virulence Mechanisms of *Mycobacterium abscessus*: Current Knowledge and Implications for Vaccine Design. *Frontiers in Microbiology*, 13, 557. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.842017/BIBTEX>

- Field, S. K., & Cowie, R. L. (2006). Lung Disease Due to the More Common Nontuberculous Mycobacteria. *CHEST*, 129(6), 1653–1672. <https://doi.org/10.1378/CHEST.129.6.1653>
- Ganapathy, U. S., Dartois, V., & Dick, T. (2019). Repositioning rifamycins for Mycobacterium abscessus lung disease. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 14(9), 867. <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1629414>
- Ghyselinck, J., Pfeiffer, S., Heylen, K., Sessitsch, A., & De Vos, P. (2013). The Effect of Primer Choice and Short Read Sequences on the Outcome of 16S rRNA Gene Based Diversity Studies. *PLOS ONE*, 8(8), e71360. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0071360>
- Gillespie, S. H., Basu, S., Dickens, A. L., O'Sullivan, D. M., & McHugh, T. D. (2005). Effect of subinhibitory concentrations of ciprofloxacin on Mycobacterium fortuitum mutation rates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(2), 344–348. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKI191>
- Griffith, D. E., Aksamit, T., Brown-Elliott, B. A., Catanzaro, A., Daley, C., Gordin, F., Holland, S. M., Horsburgh, R., Huitt, G., Iademarco, M. F., Iseman, M., Olivier, K., Ruoss, S., Von Reyn, C. F., Wallace, R. J., & Winthrop, K. (2007). An official ATS/IDSA statement: Diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 175(4), 367–416. <https://doi.org/10.1164/rccm.200604-571ST>
- Gupta, R. S. (2014). Identification of Conserved Indels that are Useful for Classification and Evolutionary Studies. *Methods in Microbiology*, 41, 153–182. <https://doi.org/10.1016/BS.MIM.2014.05.003>
- Gupta, R. S., Lo, B., & Son, J. (2018). Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus Mycobacterium into an emended genus Mycobacterium and four novel genera. *Frontiers in Microbiology*, 9(FEB), 67. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00067>
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(9), 1–9. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K., & Wellington, E. M. H. (1997). Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(8), 3233. <https://doi.org/10.1128/AEM.63.8.3233-3241.1997>
- Ho, Y. S., Adroub, S. A., Aleisa, F., Mahmood, H., Othoum, G., Rashid, F., Zaher, M., Ali, S., Bitter, W., Pain, A., & Abdallah, A. M. (2012). Complete Genome Sequence of Mycobacterium fortuitum subsp. fortuitum Type Strain DSM46621. *Journal of Bacteriology*, 194(22), 6337. <https://doi.org/10.1128/JB.01461-12>
- Hoefsloot, W., Van Ingen, J., Andrejak, C., Ängeby, K., Bauriaud, R., Bemer, P., Beylis, N., Boeree, M. J., Cacho, J., Chihota, V., Chimara, E., Churchyard, G., Cias, R., Daza, R., Daley, C. L., Dekhuijzen, P. N. R., Domingo, D., Drobniewski, F., Esteban, J., ... Wagner, D. (2013). The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study. *European Respiratory Journal*, 42(6), 1604–1613. <https://doi.org/10.1183/09031936.00149212>
- Huang, W. C., Yu, M. C., & Huang, Y. W. (2020). Identification and drug susceptibility testing for nontuberculous mycobacteria. *Journal of the Formosan Medical Association*, 119, S32–S41. <https://doi.org/10.1016/J.JFMA.2020.05.002>
- Kim, Bum Joon, Lee, S. H., Lyu, M. A., Kim, S. J., Bai, G. H., Kim, S. J., Chae, G. T., Kim, E. C., Cha, C. Y., & Kook, Y. H. (1999). Identification of Mycobacterial Species by Comparative Sequence Analysis of the RNA Polymerase Gene (rpoB). *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), 1714. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.6.1714-1720.1999>
- Kim, Byoung Jun, Hong, S. H., Kook, Y. H., & Kim, B. J. (2013). Molecular Evidence of Lateral Gene Transfer

- in *rpoB* Gene of *Mycobacterium yongonense* Strains via Multilocus Sequence Analysis. *PLoS ONE*, 8(1), 51846. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0051846>
- Kim, H., Kim, S. H., Shim, T. S., Kim, M. N., Bai, G. H., Park, Y. G., Lee, S. H., Chae, G. T., Cha, C. Y., Kook, Y. H., & Kim, B. J. (2005). Differentiation of *Mycobacterium* species by analysis of the heat-shock protein 65 gene (*hsp65*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(4), 1649–1656. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.63553-0/CITE/REFWORKS>
- Kim, S. H., & Shin, J. H. (2018). Identification of nontuberculous mycobacteria using multilocus sequence analysis of 16S rRNA, *hsp65*, and *rpoB*. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 32(1). <https://doi.org/10.1002/JCLA.22184>
- Klein, E. Y., Tseng, K. K., Pant, S., & Laxminarayan, R. (2019). Tracking global trends in the effectiveness of antibiotic therapy using the Drug Resistance Index. *BMJ Global Health*, 4(2), e001315. <https://doi.org/10.1136/BMJGH-2018-001315>
- Kwon, Y. S., Daley, C. L., & Koh, W. J. (2019). Managing antibiotic resistance in nontuberculous mycobacterial pulmonary disease: challenges and new approaches. *https://doi.org/10.1080/17476348.2019.1638765*, 13(9), 851–861. <https://doi.org/10.1080/17476348.2019.1638765>
- Lambert, P. A. (2002). Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 92(s1), 46S-54S. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2672.92.5S1.7.X>
- 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/S1>
- Lee, M. R., Sheng, W. H., Hung, C. C., Yu, C. J., Lee, L. N., & Hsueh, P. R. (2015). *Mycobacterium abscessus* complex infections in humans. *Emerging Infectious Diseases*, 21(9), 1638–1646. <https://doi.org/10.3201/EID2109.141634>
- Maleki, M. R., Kafil, H. S., Harzandi, N., & Moaddab, S. R. (2017). Identification of nontuberculous mycobacteria isolated from hospital water by sequence analysis of the *hsp65* and 16S rRNA genes. *Journal of Water and Health*, 15(5), 766–774. <https://doi.org/10.2166/WH.2017.046>
- Mohanta, T., & Goel, S. (2014). Prevalence of antibiotic-resistant bacteria in three different aquatic environments over three seasons. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(8), 5089–5100. <https://doi.org/10.1007/S10661-014-3762-1>
- Moreno-Izquierdo, C., Zurita, J., Contreras-Yametti, F. I., & Jara-Palacios, M. A. (2020). *Mycobacterium abscessus* subspecies *abscessus* infection associated with cosmetic surgical procedures: Cases series. *IDCases*, 22. <https://doi.org/10.1016/J.IDCR.2020.E00992>
- Muñoz Cedeño, V. E. (2020). *Aislamiento y genotipificación de las primeras micobacterias ambientales en el centro-norte del Ecuador*. <http://localhost:8080/xmlui/handle/123456789/3692>
- Nasre-Nasser, R., & Muñoz-López, G. (2018). Infección por *Mycobacterium scrofulaceum* en un niño de las Islas Galápagos - Ecuador. *Revista Chilena de Infectología*, 35(6), 705–709. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182018000600705>
- Palacios Vargas, D. V. (2021). *Mycobacterium terrae*: reporte de caso. *Revista Ecuatoriana de Ciencia, Tecnología e Innovación En Salud Pública*, 1–4. <https://doi.org/10.31790/inspilip.v5i2.219>
- Rahama, O., & Thaker, H. (2013). Atypical mycobacteria: an important differential for the general physician. *Clinical Medicine*, 13(5), 504. <https://doi.org/10.7861/CLINMEDICINE.13-5-504>

- Ringuet, H., Akoua-Koffi, C., Honore, S., Varnerot, A., Vincent, V., Berche, P., Gaillard, J. L., & Pierre-Audigier, C. (1999). hsp65 sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(3), 852–857. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.3.852-857.1999>
- Romero, J. J., Herrera, P., Cartelle, M., Barba, P., Tello, S., & Zurita, J. (2016). Panniculitis caused by *Mycobacterium monacense* mimicking erythema induratum: A case in Ecuador. *New Microbes and New Infections*, 10, 112–115. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2016.01.006>
- Roux, A. L., Viljoen, A., Bah, A., Simeone, R., Bernut, A., Laencina, L., Deramaudt, T., Rottman, M., Gaillard, J. L., Majlessi, L., Brosch, R., Girard-Misguich, F., Vergne, I., de Chastellier, C., Kremer, L., & Herrmann, J. L. (2016). The distinct fate of smooth and rough *Mycobacterium abscessus* variants inside macrophages. *Open Biology*, 6(11). <https://doi.org/10.1098/RSOB.160185>
- Runyon, E. H. (1965). Typical Mycobacteria: Their classification. *The American Review of Respiratory Disease*, 91, 288–289. <https://doi.org/10.1164/ARRD.1965.91.2.288>
- Sakai, T., Hisaeda, H., Ishikawa, H., Maekawa, Y., Zhang, M., Nakao, Y., Takeuchi, T., Matsumoto, K., Good, R. A., & Himeno, K. (1999). Expression and role of heat-shock protein 65 (HSP65) in macrophages during *Trypanosoma cruzi* infection: involvement of HSP65 in prevention of apoptosis of macrophages. *Microbes and Infection*, 1(6), 419–427. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(99\)80045-8](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(99)80045-8)
- Sassi, M., & Drancourt, M. (2014). Genome analysis reveals three genomospecies in *Mycobacterium abscessus*. *BMC Genomics*, 15(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-359/FIGURES/4>
- Saxena, S., Spaink, H. P., & Forn-Cuní, G. (2021). Drug Resistance in Nontuberculous Mycobacteria: Mechanisms and Models. *Biology*, 10(2), 1–22. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY10020096>
- Sha, W., Weng, X. hua, Xiao, H. ping, & He, G. jun. (2003). [Investigation of drug-resistance to rifampin and rpoB gene sequence analysis of *Mycobacterium abscessus*]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi = Zhonghua Jiehe He Huxi Zazhi = Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 26(9), 544–547. <https://europepmc.org/article/med/14521758>
- Sharma, S., & Upadhyay, V. (2020). Epidemiology, diagnosis & treatment of non-tuberculous mycobacterial diseases. *The Indian Journal of Medical Research*, 152(3), 185. https://doi.org/10.4103/IJMR.IJMR_902_20
- Telenti, A., Marchesi, F., Balz, M., Bally, F., Bottger, E. C., & Bodmer, T. (1993). Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(2), 175–178. <https://doi.org/10.1128/JCM.31.2.175-178.1993>
- Tortoli, E. (2003). Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(2), 319–354. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.319-354.2003>
- Vega, D., Moreno, J. E., & Mansilla, E. C. (2016). *Métodos de determinación de sensibilidad a los antimicrobianos en micobacterias*.
- Winburn, B., & Sharman, T. (2022). Atypical Mycobacterial Disease. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556117/>
- Woodley, C. L., Kilburn, J. O., David, H. L., & Silcox, V. A. (1972). Susceptibility of Mycobacteria to Rifampin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2(4), 245. <https://doi.org/10.1128/AAC.2.4.245>
- Zelazny, A. M., Root, J. M., Shea, Y. R., Colombo, R. E., Shamputa, I. C., Stock, F., Conlan, S., McNulty, S., Brown-Elliott, B. A., Wallace, R. J., Olivier, K. N., Holland, S. M., & Sampaio, E. P. (2009). Cohort study of molecular identification and typing of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium massiliense*, and *Mycobacterium bolletii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(7), 1985–1995. <https://doi.org/10.1128/JCM.01688-08>
- Zhou, L., Ma, C., Xiao, T., Li, M., Liu, H., Zhao, X., Wan, K., & Wang, R. (2019). A new single gene differential biomarker for mycobacterium tuberculosis complex and non-tuberculosis mycobacteria.

Frontiers in Microbiology, 10(AUG), 1887. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.01887/BIBTEX>

Zhou, L., Xu, D., Liu, H., Wan, K., Wang, R., & Yang, Z. (2020). Trends in the Prevalence and Antibiotic Resistance of Non-tuberculous Mycobacteria in Mainland China, 2000–2019: Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Public Health*, 8, 295. <https://doi.org/10.3389/FPUBH.2020.00295/BIBTEX>

Zurita, J., Ortega-Paredes, D., Mora, M., Espinel, N., Parra, H., Febres, L., & Zurita-Salinas, C. (2014). Characterization of the first report of *Mycobacterium timonense* infecting an HIV patient in an Ecuadorian hospital. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(12), O1113–O1116. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12675>