



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS CAUSANTES DE
ENFERMEDADES GRANULOMATOSAS EN TILAPIA
CULTIVADA EN GRANJAS COMERCIALES Y ESTUDIO DEL
MICROBIOMA ASOCIADO A LAS LESIONES CAUSADAS**

Por:

Pablo Martínez Lara

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

APROBACIÓN

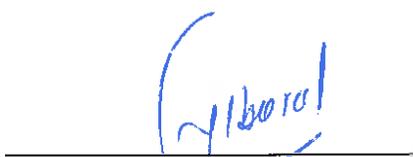
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Pablo Martínez Lara han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.


Dr. Marcel Martínez Porchas
Director de Tesis


Dr. Jorge Hernández López
Codirector de Tesis

Dr. Teresa Gollas Galván (†)
Integrante del comité de tesis


Dra. Gloria Yepiz Plascencia
Integrante del comité de tesis


Dr. Francisco Vargas Albores
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Estudio del Microbioma Asociado a Lesiones Granulomatosas Bacterianas en Tilapia de Cultivos Acuícolas" es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Pablo Martínez Lara, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos

Dra. Graciela Caire Juvera
Directora General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por otorgarme los recursos educativos y económicos durante estos años para el desarrollo de mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) por recibirme y permitirme ser parte del programa de posgrados, brindarme las herramientas necesarias para realizar los estudios de posgrado.

Al Proyecto No. A1-S-36629 que financió el proyecto “Estudio genómico y transcriptómico de las enfermedades granulomatosas en tilapia: un modelo para entender la interacción huésped patógeno en peces”.

A la Coordinación de Alimentos de Origen Animal, especialmente al Laboratorio de Biología Experimental y su equipo de trabajo, por darme la oportunidad de trabajar en esta área de investigación y ofrecerme su respaldo académico.

A la Dra. Teresa Gollas Galván[†], por permitirme ser su alumno de posgrado y tenerme la confianza de poder culminar con este proyecto. Gracias, por tanto.

A mi director de tesis, Dr. Marcel Martínez Porchas, por su gran ayuda, paciencia y dirección en la última etapa de este proyecto de tesis. Sin su apoyo nada de esto hubiera sido posible.

A mi codirector de tesis, Dr. Jorge Hernández López por su paciencia, sus conocimientos y dirección. Sobre todo, por hacerme recuperar la esperanza de volver al programa y poder culminarlo.

A los Dra. Gloria Yepiz Plascencia y Francisco Vargas Albores por sus consejos, recomendaciones y aportes durante todos estos años. Fueron un gran apoyo durante el proyecto.

A Daniel Eduardo Coronado Molina por su asistencia y apoyo durante la fase experimental.

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Biología Experimental, a los Dres. Estefanía Garibay Valdez y David Rajme por su solidaridad y disposición para ayudar con los análisis metagenómicos. Muchas gracias.

A la Coordinación de programas académicos por ayudarme y orientarme en los procesos administrativos.

A mis amigos, Rommel Pacheco y Ángel Baldenebro, que, aunque no tienen idea de lo que les

platicaba, fingían poner atención y entre risas me desahogaba. Les deseo lo mejor

A mi madre, Teresa de Jesús Lara Ruiz que siempre ha estado pendiente de mi en la salud y la enfermedad, procurando mi bienestar. Todo es por ti.

A mi tía, Soledad Lara Ruiz (†), que fue una segunda madre para mí, fue un apoyo, sustento económico y de amor absoluto. Por ella terminé mi licenciatura y maestría, y aunque ya no está con nosotros, culminé este posgrado. Sinceramente siempre estaré agradecido.

A mi hijo, Ebrahim, que, sin saberlo, me da fuerza para seguir adelante.

Finalmente, a mi prometida la Dra. Anna Judith Pérez Báez que ha sido un enorme apoyo emocional y sustento los últimos dos años. Eres y has sido un respiro en esta odisea. Te amo.

DEDICATORIA

A Dios por ser proveedor de todo lo que soy y lo que tengo.

A mis abuelos Bernabé Lara Valenzuela[†] y Josefina Ruiz Duarte[†]

A mi primo Bernabé de Jesús Lara Herrera[†]

A mi tía Soledad Lara Ruíz[†]

A mi madre, Teresa de Jesús Lara Ruiz.

Todo lo que soy, es gracias a lo que fueron y serán para mí.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
CONTENIDO	7
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
1. SINOPSIS	11
1.1. Justificación.....	11
1.2. Antecedentes.....	12
1.2.1. Lesiones Granulomatosas	12
1.2.2. Enfermedades Granulomatosas.....	13
1.2.3. Bacterias Asociadas a Lesiones Granulomatosas	16
1.2.4. Coinfecciones.....	18
1.2.5. Identificación de Microorganismos en la Acuicultura	19
1.3. Hipótesis	23
1.4. Objetivo General.....	23
1.5. Objetivos Específicos	23
1.6. Sección Integradora	23
2. GRANULOMATOSIS IN FISH AQUACULTURE: A MINI REVIEW	29
3. FIRST IDENTIFICATION OF PATHOGENIC <i>Edwardsiella anguillarum</i>, <i>Nocardia asteroides</i> AND <i>Streptococcus agalactiae</i> IN TILAPIA (<i>Oreochromis niloticus</i>) FARMED IN MEXICO	39
4. MICROBIOTA ATTACHED TO AND ENCAPSULATED BY GRANULOMAS DISSECTED FROM TILAPIA SPLEEN: A CASE REPORT	74
5. PERFIL METAGENÓMICO DE LESIONES GRANULOMATOSAS BACTERIANAS EN TILAPIA (<i>Oreochromis niloticus</i>) DE GRANJAS DE CULTIVO	81
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN GENERAL	92
7. CONCLUSIONES GENERALES	94
8. RECOMENDACIONES	95
9. BIBLIOGRAFÍA	96

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema general de la formación de granulomas. Bacterias como <i>Mycobacterium marinum</i> desencadenen la muerte celular dentro de las células fagocíticas de los peces cebras	14
2	Esquema general correspondiente a las etapas del proyecto. Identificación de bacterias causantes de enfermedades granulomatosas en tilapia cultivada en granjas comerciales y estudio del microbioma asociado a las lesiones causadas.....	24

RESUMEN

Las enfermedades granulomatosas bacterianas son un grave riesgo económico para la acuicultura, especialmente para la producción de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*). Tradicionalmente la detección de brotes infecciosos se realiza mediante cultivos bacteriológicos; sin embargo, es crucial utilizar métodos moleculares de nueva generación para investigar la presencia de comunidades bacterianas que podrían estar involucradas en coinfecciones. Este estudio tuvo como objetivo analizar el microbioma de lesiones granulomatosas de tilapia de cultivos acuícolas, identificar los patógenos responsables y confirmar su virulencia. Se procesaron muestras de lesiones granulomatosas en bazo de tilapia de granjas acuícolas localizadas en los estados de Morelos, Sinaloa y Chiapas. Se analizaron muestras de lesiones en el bazo de tilapia y se secuenció la región V4 del gen ARNr 16S para determinar la asignación taxonómica y la diversidad microbiana. Se realizaron pruebas bacteriológicas a los aislados, seguido de la secuenciación del gen completo del ARNr 16S y un ensayo experimental infectando tilapias sanas con las bacterias aisladas. Se observaron diferencias en la diversidad alfa y beta entre las muestras, con una mayor diversidad en Morelos, donde se identificaron más de 15 filos, aunque solo tres fueron dominantes. Las poblaciones bacterianas de Sinaloa y Chiapas fueron similares entre sí, pero diferentes a las de Morelos. Los análisis genéticos identificaron los patógenos *Edwardsiella anguillarum*, *Nocardia asteroides* y *Streptococcus agalactiae*, con similitudes del 99.63%, 99.45% y 100%, respectivamente, respecto a las secuencias en la base de datos GenBank. Durante los experimentos, se logró reproducir el proceso infeccioso en tilapias sanas, y las bacterias inoculadas se recuperaron del bazo, aunque no se observaron lesiones granulomatosas en el tiempo previsto. El estudio reveló la existencia de tres brotes independientes causados por distintos patógenos en las granjas de tilapia comerciales, subrayando la importancia de emplear técnicas avanzadas de detección y caracterización para mejorar el control y prevención de enfermedades en la acuicultura.

Palabras clave: *Edwardsiella anguillarum*, *Nocardia asteroides*, *Streptococcus agalactiae*, tilapia, *Oreochromis niloticus*, lesiones granulomatosas, ARNr 16S

ABSTRACT

Bacterial granulomatous diseases represent a significant economic risk for aquaculture, especially in the production of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Infectious outbreaks are often detected through bacteriological cultures; however, it is crucial to use next-generation molecular methods such as high-throughput sequencing, particularly to investigate the presence of bacterial communities that could be involved as coinfections. This study aimed to analyze the microbiome of granulomatous lesions in farmed tilapia, identify the responsible pathogens, and confirm their virulence through an experimental infection in seemingly healthy tilapia. Granulomatous spleen lesion samples from tilapia farms located in the states of Morelos, Sinaloa, and Chiapas were processed. Spleen lesion samples were analyzed, and the V4 region of the 16S rRNA gene was sequenced to determine taxonomic assignment and microbial diversity. Conventional bacteriological, biochemical, and morphological tests were also conducted on the isolated bacteria, followed by complete 16S rRNA gene sequencing and an experimental challenge with the isolated bacteria in healthy tilapia. Differences in alpha and beta diversity were observed among the samples, with higher diversity in Morelos, where over 15 phyla were identified, although only three were dominant. The bacterial populations from Sinaloa and Chiapas were similar to each other but differed from those in Morelos. Genetic analyses identified the pathogens *Edwardsiella anguillarum*, *Nocardia asteroides*, and *Streptococcus agalactiae*, with similarities of 99.63%, 99.45%, and 100%, respectively, compared to sequences in the GenBank database. During the experiments, the infectious process was successfully reproduced in healthy tilapia, and the inoculated bacteria were recovered from the spleen, although no granulomatous lesions were observed within the expected timeframe. The results highlight three distinct outbreaks caused by different pathogens that occurred independently in three commercial tilapia farms. This underscores the importance of using advanced pathogen detection and characterization methods in aquaculture to prevent and control diseases.

Keywords: *Edwardsiella anguillarum*, *Nocardia asteroides*, *Streptococcus agalactiae*, tilapia, *Oreochromis niloticus*, granulomatous lesions, 16S rRNA.

1. SINOPSIS

1.1 Justificación

La acuicultura es considerada una de las actividades económicas de mayor crecimiento en la industria de los alimentos en los últimos años (Dadar *et al.*, 2016; Martínez-Lara *et al.*, 2021). Los reportes de la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA, 2022) mencionan que México tuvo una producción total de 1,950,011 toneladas (ton) en peso vivo. De esta producción, la acuicultura representa solamente el 18% del total con 351,002 ton. Sonora se encuentra dentro de los cinco principales estados productores acuícolas, con Sinaloa registrando 108,074 ton, Sonora 93,185, Chiapas 38,535, Nayarit 24,268 y Michoacán 13,071.

Dentro de la industria acuícola, la tilapia (*Oreochromis niloticus*) es cultivada en diferentes regiones y, gracias a su gran resiliencia, puede tolerar distintas condiciones. Esto la convierte en un fuerte blanco para el mercado gracias a su gran adaptabilidad (Santos *et al.*, 2019). En México es considerada la especie dulceacuícola que mayormente se produce a nivel nacional y la segunda en volumen de producción en peso vivo después del camarón (CONAPESCA, 2022). Sin embargo, la expansión sostenible del sector se ve obstaculizada por una serie de factores entre los cuales las enfermedades desempeñan un papel prominente, especialmente en las primeras etapas de desarrollo (Vadstein *et al.*, 2013; Dhar *et al.*, 2014).

La densidad en cultivo es un factor crucial que debe ser cuidadosamente optimizado para maximizar el rendimiento y minimizar las incidencias biológicas y los trastornos de comportamiento inducidos por enfermedades (Abdel-Tawwab, 2012). Se ha comprobado que altas densidades de cultivo incompatibles con las condiciones fisicoquímicas de los sistemas de producción, no solo reducen el crecimiento de los peces, sino que también comprometen la respuesta inmunológica, lo que resulta en una menor ingesta alimentaria y una conversión ineficiente del alimento en biomasa (Ellis *et al.*, 2002). Este tipo de condición puede inducir estrés en los organismos, afectando negativamente su bienestar y productividad, ya que el estrés crónico se ha asociado con un crecimiento reducido, comportamientos anormales e inmunosupresión. El riesgo de mortalidad en los organismos aumenta cuando las enfermedades, una vez iniciadas,

persisten.

Factores como el estrés, la inmunosupresión, la mala alimentación y la baja calidad del agua pueden contribuir a la pérdida de organismos por muerte. La mortalidad asociada a enfermedades en granjas comerciales de tilapia puede alcanzar hasta el 80%, incluso en animales que han alcanzado tamaño comercial; lo que genera pérdidas económicas para la industria (Rajme-Manzur *et al.*, 2023). La intensificación de los procesos de cultivo implica utilizar grandes densidades de individuos, lo que representa uno de los factores que influyen en el desencadenamiento de procesos infecciosos. Si bien, la intensificación de la producción es una prioridad, mantener un riguroso control de la calidad del agua, llevar a cabo la supervisión de la alimentación y la vigilancia sanitaria son medidas esenciales.

Aproximadamente el 55% de las enfermedades en la industria acuícola son causadas por bacterias (Dhar *et al.*, 2014), las cuales se pueden clasificar en no granulomatosas y granulomatosas. Estas últimas representan un grave peligro para la acuicultura debido a su carácter crónico, lo que les permite persistir durante largos periodos y pasar desapercibidas hasta que es demasiado tarde para intervenir eficazmente en el lote o la granja afectada. En la acuicultura mexicana se ha reportado la presencia de enfermedades granulomatosas causadas por diversas bacterias en distintas especies acuícolas, provocando pérdidas económicas considerables (Ortega *et al.*, 2018; Del Rio-Rodriguez *et al.*, 2021; Martínez-Lara *et al.*, 2022).

1.2 Antecedentes

1.2.1 Lesiones Granulomatosas

Los trastornos granulomatosos son patologías que comprenden una familia numerosa y presentan el denominador histológico de la formación del granuloma. Pueden mostrar cuadros clínicos agudos o crónicos causados por diferentes factores, comúnmente de origen autoinmune o infeccioso (James, 2000; Alberts, 2011). Los cuadros de granulomatosis de origen infeccioso que afectan tanto a humanos como a peces, se caracterizan por una deficiencia en la fagocitosis del

agente etiológico y no suelen controlarse con facilidad mediante otros mecanismos inflamatorios (Arellano, 2019). Las enfermedades granulomatosas se caracterizan por presentar lesiones granuladas y compactas de tejido, originado ocasionalmente por procesos infecciosos; estas están constituidas por aglomeraciones de células de distintas líneas leucocitarias dinámicas y bien organizadas, incluyendo macrófagos infectados y no infectados, fibroblastos y células epiteliales (Adams, 1974). Las células del sistema inmunológico al entrar en contacto con el patógeno inducen una cascada de señalización de naturaleza anti y pro-inflamatoria. Esto desencadena un reclutamiento y acumulación de macrófagos y otros leucocitos en tejido. Eventualmente, se forman los granulomas o lesiones granulomatosas debido a la interacción compleja entre el organismo invasor o la antigenemia prolongada; en este sentido, la actividad de los macrófagos, la respuesta de las células Th1, la hiperactividad de las células B y una vasta gama de mediadores biológicos se ven involucrados (James, 2000). En la mayoría de los casos, las infecciones no resultan en una enfermedad gracias a los mecanismos de evasión que algunas bacterias presentan, como es el caso de *Mycobacterium marinum*. Este tipo de bacterias han desarrollado la habilidad para sobrevivir creando un nicho con el sistema inmune dentro de las lesiones granulomatosas, lo que les permite permanecer en estado de latencia por décadas (Ommani, 2011).

1.2.2 Enfermedades Granulomatosas

Las enfermedades granulomatosas son un desafío recurrente en la acuicultura a nivel mundial debido a su naturaleza crónica (Rajme-Manzur *et al.*, 2021). Esta cronicidad se atribuye tanto a la reproducción lenta del patógeno como a una resistencia inmunológica crónica, en la que el sistema inmune, en lugar de activarse para erradicar el patógeno, forma granulomas en el tejido, encapsulándolo (Lin *et al.*, 2006; Martínez-Lara *et al.*, 2021). El dogma central de las enfermedades granulomatosas sostiene que la formación de granulomas tiene como objetivo controlar la infección mientras se erradica. Sin embargo, en ciertas infecciones, como las causadas por *M. tuberculosis* en humanos, el patógeno es capaz de aprovechar el reclutamiento para mantener la lesión granulomatosa, creando así un ambiente propicio para su posterior reproducción (Martinot, 2018). Este fenómeno ha sido observado en estudio con ratones y peces cebras, donde se han utilizado

cepas de *M. tuberculosis* con genes deficientes asociados al reclutamiento celular, mediado por la producción de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α). Estos estudios han demostrado que la deficiencia en la señalización de TNF α resulta en la formación de granulomas incompletos o no duraderos, lo que impide un control efectivo de la infección (Clay *et al.*, 2008; Petersen and Smith, 2013).

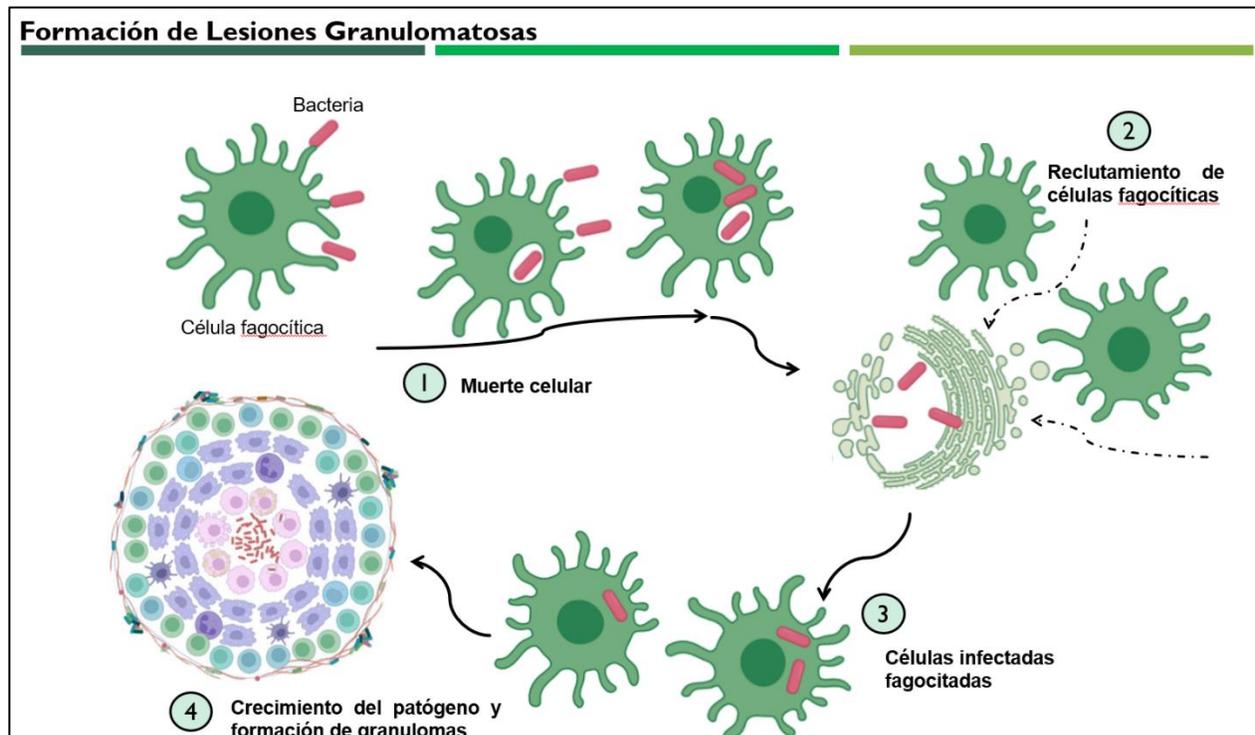


Figura 1.- Esquema general de la formación de granulomas. (1) Bacterias como *M. marinum* desencadenan la muerte celular dentro de las células fagocíticas de los peces cebra. (2) Las células infectadas reclutan células no infectadas. (3) Las células reclutadas terminan fagocitando los residuos celulares con bacterias en su interior. (4) Esto finaliza creando un entorno favorable para el crecimiento bacteriano y permitiendo la salida de células infectadas para formar nuevos granulomas (Davis and Ramakrishnan, 2009). Creado en Biorender.com (BioRender, 2022).

La principal vía de infección por patógenos en los peces es a través de lesiones en la piel y el tracto gastrointestinal (Austin, 1999), y se ha debatido sobre la posibilidad de otras vías como los ojos y las branquias. Aunque las vías de infección de agentes asociados con lesiones granulomatosas, como los géneros bacterianos *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Francisella* y otros, no se conocen completamente, se postula que podrían introducirse a través de las branquias, el músculo y otros

sitios lesionados (Maekawa *et al.*, 2018). Esto ha sido observado en el jurel (*Seriola quinqueradiata*) que sufre infecciones por *Nocardia*, causando lesiones en las branquias, la dermis y el músculo (Itano *et al.*, 2006a).

Es importante destacar que la ruta de infección es un factor crucial en las tasas de mortalidad cuando estas infecciones ocurren en los peces. Por ejemplo, mientras que las infecciones intradérmicas tienden a progresar, la mortalidad y la propagación de la enfermedad son mayores en infecciones intraperitoneales o por inmersión (Itano *et al.*, 2006a). En algunos casos, las infecciones no resultan en enfermedad porque algunas bacterias, como *M. marinum*, han desarrollado estrategias de evasión para vivir en equilibrio con el sistema inmunitario, permaneciendo en estado latente durante períodos prolongados (Ommani, 2011). Sin embargo, un sistema inmunitario suprimido, acompañado de la aparición de lesiones y condiciones ambientales desfavorables, podrían desencadenar la proliferación de estas bacterias, llevando a la enfermedad granulomatosa (Reavill and Schmidt, 2012). Este mismo patrón ocurre en la transmisión de la enfermedad granulomatosa a los humanos. Se ha argumentado que las infecciones diseminadas de *M. marinum* en los peces son raras en los humanos, pero casi siempre ocurren en individuos inmunosuprimidos (Lewis *et al.*, 2003). Desde la revisión de Dahm and Geisler (2006), el uso del pez cebra como modelo vertebrado para estudiar enfermedades humanas ha aumentado enormemente (Ribas and Piferrer, 2014; Jorgensen, 2020). Los patógenos que causan enfermedades en el pez cebra son naturalmente importantes para la acuicultura, lo que lo convierte en un modelo adecuado para estudiar enfermedades en peces a pesar de la distancia genética con otras especies de peces, como la carpa, los salmónidos y la tilapia; sin embargo, conocer estos mecanismos de acción y su patogenicidad en otras especies resultaría de gran interés para la comunidad científica.

A pesar de la gran importancia económica y de seguridad alimentaria que posee la tilapia por los volúmenes de producción que se manejan, no existe un modelo experimental estandarizado para poder elucidar mecanismos de infección relacionados a lesiones granulomatosas. En México, únicamente se reportan casos de incidencia de enfermedades granulomatosas por distintas bacterias y no siempre es en tilapia (Ortega *et al.*, 2016; Ortega *et al.*, 2018; Del Rio-Rodriguez *et al.*, 2021). Es importante destacar que existen una gran cantidad de especies y cepas de bacterias que producen lesiones granulomatosas (Puk and Guz, 2020; Rajme-Manzur *et al.*, 2021; Elgendy *et al.*, 2022; Nawaz *et al.*, 2022; Sun *et al.*, 2022; Pavludi *et al.*, 2023; Dinh-Hung *et al.*, 2024) y no

granulomatosas (Mwainge *et al.*, 2021; Mia *et al.*, 2022), sin mencionar aquellas bacterias que no son cultivables en medios tradicionales o en cualquier otro medio existente (Streit and Schmitz, 2004; Martínez-Porchas and Vargas-Albores, 2017).

1.2.3 Bacterias Asociadas a Lesiones Granulomatosas

Las micobacterias pertenecen al género *Mycobacterium* (Orden: *Actinomycetales*, suborden: *Corynebacterineae*, familia: *Mycobacteriaceae*), son pleomórficas, Gram-positivas, aeróbicas, sin motilidad en forma de bastones, midiendo 0.2-0.6 µm de diámetro y 1-10 µm de largo. Tienen una pared celular única que incluye una cadena larga (60-90 carbonos) del ácido 3-hidroxi micólico (Draper, 1971; Gangadharam and Jenkins, 1997). De acuerdo con el esquema de clasificación Runyon, las micobacterias, con excepción de aquellas especies que no pueden ser cultivadas *in vitro*, son funcionalmente separadas por tiempo de crecimiento y pigmentación. Las de rápido crecimiento pueden requerir menos de siete días para presentar crecimiento en agar sólido, mientras que las de lento crecimiento pueden ocupar de semanas hasta meses. Con algunas excepciones, las de lento crecimiento pueden tener una mayor extensión de la hélice del ARNr 16S (ácido ribonucleico) de la subunidad pequeña ribosomal y un operón para estos genes ARNr. En contraste, las de rápido crecimiento tienden a tener una hélice más corta de este ARNr y dos operones para este gen (Bercovier *et al.*, 1986; Menendez *et al.*, 2002).

La micobacteriosis es una enfermedad ocasionada por bacterias del género *Mycobacterium* (Gauthier and Rhodes, 2009), que puede infectar humanos, peces y otros animales. Las especies mayormente asociadas a micobacteriosis en peces son *M. marinum*, *M. fortuitum* y *M. chelonae* (Gauthier and Rhodes, 2009). Por lo general, éstas producen una enfermedad crónica que puede no presentar sintomatología. Afecta a todos los tejidos incluyendo ojos, branquias, órganos viscerales, musculatura y escamas. Los síntomas externos no son específicos y pueden presentarse como pérdida de las escamas, ulceraciones dérmicas, cambios en la pigmentación, comportamiento anormal, defectos en las espinas entre otros signos (Nigrelli and Vogel, 1963; Ross, 1970). Dentro de los signos más graves se puede encontrar agrandamiento del bazo, riñones e hígado, con la presencia de nódulos blancos o grises en órganos internos. Aunque la micobacteriosis no se asocia

a mortalidad de peces silvestres, sí se le vincula con pérdidas significativas dentro de la acuicultura (Gauthier and Rhodes, 2009).

La estreptococosis también se ha convertido en una amenaza para la industria de la acuicultura, especialmente en muchas especies de peces. Estas bacterias causan infecciones graves en peces cultivados en aguas cálidas, tanto de entornos marinos como de agua dulce (Geng *et al.*, 2012). Las principales especies de *Streptococcus* que predominan en las infecciones de peces son *S. iniae* y *S. agalactiae* (Gan *et al.*, 2016; Iregui *et al.*, 2016); los peces afectados tienden a manifestar natación errática, letargo y rigidez dorsal; la respuesta inflamatoria crónica sistémica se caracteriza por la presencia de granulomas en diferentes órganos (Pulido *et al.*, 2016).

Además de la micobacteriosis y la estreptococosis, los cuadros de nocardiosis causados por el género *Nocardia*, son un problema acuícola. Dentro del género *Nocardia* se encuentran bacterias Gram-positivas, sin motilidad, ácido alcohol resistentes en forma de bastones pleomórficos (Luo *et al.*, 2014). El género contiene más de 90 especies reconocidas y ampliamente distribuidas en hábitats acuáticos y terrestres. La mayoría de estas especies son conocidas por causar nocardiosis en humanos y en una gran variedad de animales, incluyendo a los peces (Kandi, 2015). Cuatro especies de *Nocardia* se han aislado de peces enfermos de nocardiosis: *N. asteroides*, *N. seriolae*, *N. salmonicida* y *N. crassostreae* (Itano *et al.*, 2006b). La nocardiosis se considera una enfermedad sistémica donde las lesiones son localizadas en la piel y varios órganos internos, con la estructura nodular típica a la formación de granulomas. Finalmente, las especies de *Francisella* son consideradas bacterias Gram-negativas, pleomórficas, sin motilidad, algunas son aerobias estrictas mientras que otras pueden ser facultativas. El género contiene especies que pueden causar enfermedades a un gran rango de hospederos, incluyendo a los humanos como lo es *F. tularensis* y en peces *F. noatunensis* (Keim *et al.*, 2007). *F. noatunensis* es el agente causal de franciselosis de la piscina en varias especies de peces (Birkbeck *et al.*, 2007; Soto *et al.*, 2009; Bakkemo *et al.*, 2011), de donde se han aislado dos subespecies: *F. noatunensis* sp. *Orientalis*, que causa enfermedades en peces de climas templados, como la tilapia (*O. niloticus*), y *F. noatunensis* sp. *Noatunensis*, que afecta a peces que viven en aguas frías, como el salmón del atlántico (*Salmo salar*) (Birkbeck *et al.*, 2007; Bakkemo *et al.*, 2011). El mayor problema en estas enfermedades es la ausencia de signos clínicos específicos, mientras se forman lesiones granulomatosas multifocales, pueden causar altas tasas de mortalidad (Soto *et al.*, 2009).

El género *Edwardsiella* es un grupo de bacterias Gram-negativas que pertenece a la familia

Hafniaceae (Adeolu *et al.*, 2016). Este género incluye especies que son patógenos importantes en peces (Reichley *et al.*, 2017), causando enfermedades que resultan en pérdidas económicas significativas en la acuicultura a nivel global (da Costa *et al.*, 2022). Las especies de *Edwardsiella* son de especial interés debido a su capacidad para infectar una amplia gama de especies acuáticas, así como a su impacto en la salud animal y humana (Park *et al.*, 2012; Buján *et al.*, 2018). La transmisión de *Edwardsiella* puede ocurrir a través del agua, del alimento contaminado y del contacto directo entre peces, lo que facilita la rápida propagación de la enfermedad en ambientes de alta densidad de cultivo (Leung *et al.*, 2019). Estas infecciones no solo conducen a una mortalidad significativa en los peces infectados, sino que afectan la producción y el rendimiento económico de las explotaciones acuícolas. Entre las diversas manifestaciones patológicas asociadas a estas infecciones, la formación de lesiones granulomatosas es un fenómeno de particular interés. Estas lesiones, caracterizadas por la agregación de células inmunitarias alrededor del patógeno, pueden tener un impacto considerable en la salud de los peces y en la productividad de la acuicultura.

1.2.4 Coinfecciones

Las coinfecciones en animales acuáticos han sido poco estudiadas a pesar de ser comunes en sistemas de acuicultura y en condiciones naturales. Estas coinfecciones son causadas por dos o más patógenos genéticamente distintos, cada uno con efectos diferentes, que pueden dañar al huésped de manera sinérgica con otros patógenos (Cox, 2001; Bakaletz, 2004). La mayoría de la literatura se enfoca en infecciones simples, considerando al otro agente como oportunista y generalmente ignorándolo (Kotob *et al.*, 2017). Sin embargo, una vez que un huésped está infectado y sufriendo la enfermedad, se vuelve susceptible a la invasión de otros microbios patógenos que empeoran su situación. Durante las coinfecciones, se producen interacciones entre los agentes infecciosos y el resultado depende de la carga de uno o varios patógenos, e incluso en este nivel, puede ocurrir competencia entre los patógenos, o no (Cox, 2001). Los entornos naturales en los que prosperan los animales acuáticos son diversos, con una amplia variedad de microorganismos heterogéneos, incluidas especies parasitarias y no parasitarias, donde las coinfecciones son

frecuentes. Aunque recientemente se ha identificado bacterias que simultáneamente causan procesos infecciosos en la acuicultura y que su detección temprana es de gran importancia (Rajme-Manzur *et al.*, 2023), existe poca información sobre coinfecciones granulomatosas en entornos acuáticos. Por ejemplo, un informe de caso reveló que no todos los peces que sufren enfermedades granulomatosas presentan coinfección, y que pueden ocurrir diferentes patrones de coinfección (*Brevoortia tyrannus*) dentro de la misma población. En un grupo de jureles atlánticos que padecían granulomatosis, se registraron no solo tres especies de micobacterias en el bazo (*M. marinum*, complejo *M. fortuitum* y *M. goodii*) (Stine *et al.* 2005), sino también una tasa de coinfección del 40% de *Mycobacterium* spp. y *Vibrio hollisae*. En otros especímenes también afectados por micobacteriosis, se aisló *Photobacterium damsela* del riñón, hígado o cerebro. Además, otro grupo de los mismos peces registró los tres patógenos, incluidos *Mycobacterium* spp., *V. hollisae* y *P. damsela*. Se podría hipotetizar que, algunas infecciones granulomatosas en acuicultura podrían ser coinfecciones, considerando el alto porcentaje de bacterias no cultivables en el ambiente acuático que pueden pasar desapercibidas o aún no han sido estudiadas (Martínez-Porchas & Vargas-Albores 2017). Tales escenarios pueden causar infecciones simultáneas que interfieren con el diagnóstico correcto de cualquier enfermedad granulomatosa, como se ha informado para la tuberculosis bovina (Barry *et al.* 2011). Por lo tanto, se necesita investigación sobre las interacciones que ocurren entre estas especies durante las infecciones mixtas y los efectos perjudiciales de las multi-infecciones en la patogénesis, pronóstico y tratamiento de enfermedades en los peces (Griffiths *et al.* 2011; Johnson & Hoverman 2012; Eswarappa *et al.*, 2012; Kotob *et al.* 2017).

1.2.5 Identificación de Microorganismos en la Acuicultura

En la acuicultura, la detección precisa y rápida de microorganismos patógenos es fundamental para gestionar la salud de los animales y minimizar pérdidas económicas. Por ello, la rápida y precisa identificación de agentes etiológicos resulta en un eficaz diseño de medidas preventivas y correctivas.

Tradicionalmente, los métodos convencionales más utilizados incluyen la microscopía, el

aislamiento de patógenos y pruebas bioquímicas (Becerra-Dorame *et al.*, 2011). No obstante, la creciente complejidad del entorno microbiano en los sistemas acuáticos ha hecho evidente que no existe un "estándar de oro" universal para la identificación de microorganismos. Esto se debe, en parte, a la diversidad de bacterias y su interacción con el ambiente y el huésped, lo que dificulta la detección temprana de enfermedades.

Con el avance de la biología molecular, han surgido nuevas herramientas que han transformado la identificación de patógenos, además del estudio de la diversidad de comunidades microbianas. El uso de técnicas como la clonación, el ADN recombinante y el análisis de amplicones por electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE: Denaturing gradient gel electrophoresis), ha permitido una mejor comprensión de la diversidad microbiana en ambientes acuícolas (H Zhang *et al.*, 2016). Detectar, identificar y caracterizar microorganismos sigue siendo un desafío complejo. En 2006, la introducción de la pirosecuenciación 454 GS 20 de Roche marcó un hito en la secuenciación de alto rendimiento, al permitir el análisis masivo de la biodiversidad y el descubrimiento de nuevas especies bacterianas (Sogin *et al.*, 2006). Para superar las limitaciones de las técnicas tradicionales, las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento, como la pirosecuenciación, facilitaron un análisis profundo y detallado de comunidades microbianas complejas, con un nivel de resolución sin precedentes (Mardis, 2008; Medini *et al.*, 2008; Armougom and Raoult, 2009). Estas tecnologías resultan especialmente valiosas para el monitoreo de enfermedades en sistemas acuícolas, aunque su uso requiere personal especializado y recursos informáticos avanzados.

Entre las técnicas moleculares más utilizadas en la acuicultura, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR: Polymerase chain reaction) se destaca por su capacidad para amplificar fragmentos de ADN específicos de manera rápida y eficiente. La PCR en tiempo real (RT-PCR: Real-Time PCR) es una variante que permite la cuantificación precisa de patógenos, lo cual es crucial en la gestión de enfermedades acuáticas (Adams and Thompson, 2011). La evolución de estas tecnologías ha continuado, con el desarrollo de técnicas que ofrecen lecturas más largas y una mayor precisión en la secuenciación del gen ARNr 16S, una herramienta clave en la identificación bacteriana (Liu *et al.*, 2007). La secuenciación del gen ARNr 16S complementa a la PCR, facilitando la identificación precisa de especies bacterianas mediante el análisis de regiones conservadas y variables del ADN ribosomal. Esta técnica es especialmente útil para diferenciar especies del género *Vibrio*, que son comunes en la acuicultura (Chatterjee and Haldar, 2012).

La secuenciación por síntesis, aunque con longitudes de lectura relativamente cortas, ha ganado

popularidad debido a sus costos reducidos y la alta profundidad de secuenciación que ofrece (Caporaso *et al.*, 2012). Este enfoque ha demostrado ser particularmente útil en el análisis de regiones hipervariables del gen ARNr 16S, proporcionando información detallada sobre la diversidad microbiana (Martínez-Porchas and Vargas-Albores, 2017).

El ribotipado es otra técnica molecular utilizada para diferenciar especies bacterianas estrechamente relacionadas. Este método implica la hibridación de ADN y el análisis de fragmentos de restricción, proporcionando una resolución detallada de la diversidad genética entre cepas de *Vibrio*. Además, la hibridación con sondas fluorescentes que se realiza *in situ* (FISH: Fluorescence *in situ* hybridization), permite detectar secuencias específicas de ADN o ARN en células bacterianas, lo que es especialmente útil para identificar bacterias en estado viable pero no cultivable (VBNC: Viable but not culture) en ambientes acuáticos (Adams and Thompson, 2011). El polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP: Restriction fragment length polymorphism) o por amplificación (AFLP: Amplified fragment length polymorphism) son técnicas que permiten analizar variaciones en secuencias de ADN mediante la digestión con enzimas de restricción y la amplificación selectiva de fragmentos de ADN, respectivamente. Estas técnicas son valiosas en estudios taxonómicos y epidemiológicos, permitiendo la diferenciación de especies estrechamente relacionadas y la identificación de biotipos específicos (Chatterjee and Haldar, 2012).

Por otro lado, el ADN Polimórfico amplificado al azar (RAPD: Random amplified polymorphic DNA) es una técnica molecular más económica y rápida que utiliza oligonucleótidos arbitrarios para amplificar segmentos de ADN sin necesidad de conocer la secuencia específica del genoma. Este método ha sido eficaz en la diferenciación de cepas patógenas y no patógenas de *V. harveyi* (Adams and Thompson, 2011). No obstante, a pesar de su eficacia, estas técnicas moleculares tienen limitaciones, como la dependencia de la selección de patógenos específicos, lo que puede llevar a la no detección de nuevos o inesperados patógenos. Además, aunque métodos como el sistema de PCR y DGGE permiten el perfilado de comunidades microbianas complejas, no ofrecen información detallada sobre la identidad de las poblaciones microbianas presentes (Chatterjee and Haldar, 2012).

Sin lugar a duda, las técnicas moleculares utilizadas para estudiar los metagenomas han emergido como un enfoque prometedor para la detección de nuevos microorganismos o aquellos no cultivables mediante el análisis de genomas complejos en un nicho microbiológico (Nielsen *et al.*, 2014). Este enfoque permite el aislamiento, amplificación y secuenciación de ADN directamente de

muestras ambientales, proporcionando información sobre la diversidad microbiana sin necesidad de cultivo previo (Jo Handelsman, 2004). Con la llegada de la secuenciación masiva, se ha logrado la caracterización de la diversidad microbiana en muestras de intestino de cualquier especie animal, incluyendo al hombre. En ambientes acuícolas, estas tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS: Next-Generation sequencing) se han aplicado en la caracterización de la comunidad microbiana en muestras de intestino de peces (Parma *et al.*, 2016), crustáceos (Hao Zhang *et al.*, 2016) y biopelículas de sistemas acuícolas (Martínez-Córdova *et al.*, 2016).

El desarrollo y la aplicación de técnicas moleculares en la acuicultura han permitido una identificación más precisa y rápida de patógenos bacterianos, lo que es crucial para la gestión efectiva de enfermedades. A medida que las tecnologías avanzan, se espera que la metagenómica y la secuenciación de alto rendimiento continúen revolucionando la detección y caracterización de microorganismos en entornos acuícolas, mejorando así la sostenibilidad y el éxito de la industria. A pesar de los avances, persisten vacíos en el conocimiento relacionados con la caracterización de las infecciones bacterianas que afectan a la tilapia, especialmente en cuanto a las lesiones granulomatosas y su etiología en ambientes controlados de cultivo.

En este contexto, el presente estudio, con el apoyo de técnicas metagenómicas busca aportar información que permitan una identificación de los patógenos presentes. En el siguiente apartado se plantea la hipótesis, que orienta los objetivos de esta investigación.

1.3 Hipótesis

El microbioma de las lesiones granulomatosas de tilapia (*O. niloticus*) en cultivos acuícolas es distinto y varía de acuerdo con las bacterias patógenas causantes de la infección.

1.4 Objetivo General

Definir la diversidad de especies bacterianas asociadas a lesiones granulomatosas de tilapia (*O.*

niloticus) comercial, identificar al agente etiológico y evaluar su patogenicidad a través de una infección experimental.

1.5 Objetivos Específicos

1. Aislar e identificar bacterias en lesiones granulomatosas de tilapias (*O. niloticus*) en cultivos acuícolas.
2. Evaluar la patogenicidad de bacterias aisladas de lesiones granulomatosas en tilapia.
3. Analizar el microbioma asociado a lesiones granulomatosas de tilapias (*O. niloticus*) muestreadas en granjas acuícolas.

1.6 Sección Integradora

Del presente trabajo, que se encuentra dividido en dos etapas, se obtuvieron dos artículos publicados, uno enviado y un borrador. En la figura 2 se muestra el esquema general de trabajo de la parte experimental y a continuación se describe de manera general los productos resultantes del proyecto de tesis doctoral en relación a los objetivos de investigación.

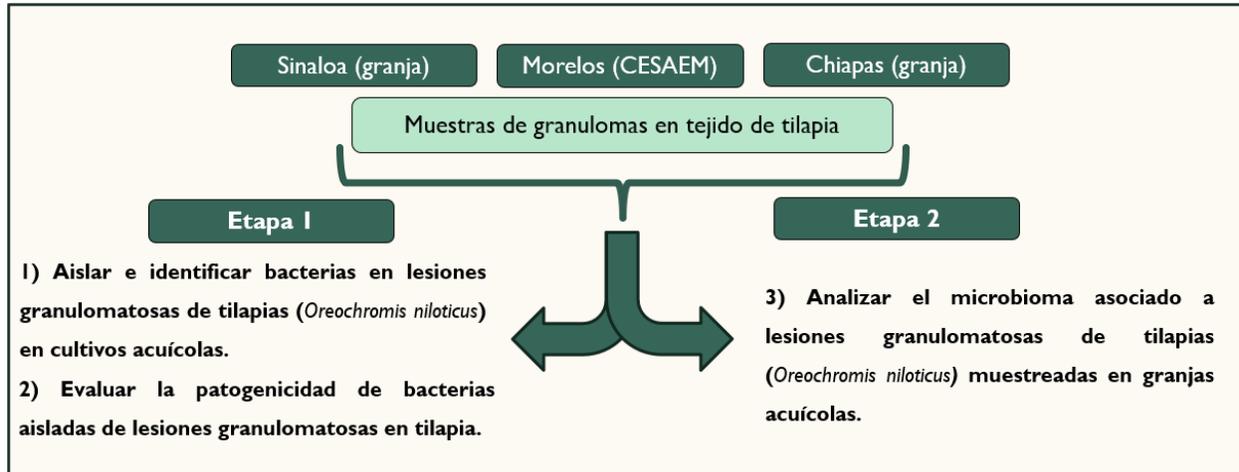


Figura 2.- Esquema general correspondiente a las etapas del proyecto. Identificación de bacterias causantes de enfermedades granulomatosas en tilapia cultivada en granjas comerciales y estudio del microbioma asociado a las lesiones causadas.

En el primer artículo titulado “Granulomatosis in fish aquaculture: a mini review” se realizó con la intención de actualizar y resaltar el estado del arte sobre las enfermedades granulomatosas bacterianas en peces de acuicultura. Las infecciones granulomatosas representan una preocupación significativa en la acuicultura de peces debido a su impacto en la salud de los peces y las pérdidas económicas asociadas. Estas infecciones son difíciles de detectar en sus primeras etapas, ya que a menudo carecen de signos clínicos distintivos y pueden confundirse fácilmente con otras enfermedades bacterianas. Las enfermedades granulomatosas son causadas por una variedad de patógenos bacterianos, especialmente especies de *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Francisella*. Estos patógenos son capaces de inducir granulomas crónicos y multifocales en los peces, lo que puede comprometer gravemente el sistema inmunológico, provocando altas tasas de mortalidad y bajo crecimiento. Las coinfecciones con múltiples patógenos son comunes en los entornos acuícolas, lo que complica aún más el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades granulomatosas. Por ejemplo, se han documentado coinfecciones con *Mycobacterium* spp. y *Vibrio* spp., lo que lleva a cuadros clínicos más graves. La presencia de múltiples patógenos puede interferir con la respuesta inmunológica y resultar en el desarrollo de infecciones crónicas que son resistentes a los tratamientos convencionales.

La revisión destaca la necesidad urgente de más investigaciones sobre los mecanismos de formación de granulomas y el desarrollo de vacunas y tratamientos efectivos para estas

enfermedades. Actualmente, hay opciones limitadas disponibles para la prevención y control de infecciones granulomatosas en peces, y los modelos experimentales existentes a menudo son inadecuados para estudiar estas enfermedades complejas. La revisión también enfatiza la importancia de la detección temprana y el desarrollo de herramientas de diagnóstico que puedan diferenciar entre infecciones simples y coinfecciones. La complejidad de estas infecciones, junto con los desafíos de detección y tratamiento temprano, subraya la necesidad de continuar con la investigación y el desarrollo de estrategias de manejo más efectivas en la acuicultura.

El segundo producto titulado “First identification of *Edwardsiella anguillarum*, *Nocardia asteroides*, and *Streptococcus agalactiae* in tilapia (*Oreochromis niloticus*) farmed in Mexico” logró cumplir con los objetivos específicos uno y dos del proyecto de investigación. Dicho artículo tuvo como objetivo aislar, identificar y evaluar la patogenicidad de bacterias asociadas a lesiones granulomatosas obtenidas de muestras en tejido esplénico de tilapia provenientes de granjas acuícolas de los estados de Morelos (MOR) en 2015, Sinaloa (SIN) en 2017 y Chiapas (CHI) en 2022. Se disectó, maceró y cultivó tejido obtenido de lesiones granulomatosas en diferentes medios de agar, incluyendo agar sangre de Columbia (CBA) y agar MacConkey. Las colonias se incubaron, se examinaron utilizando tinciones de Gram y Kinyoun; posteriormente, se sometieron a diversas pruebas bioquímicas como catalasa, oxidasa, rojo de metilo, voges-proskauer, indol, fermentación de carbohidratos, entre otras pruebas con la finalidad de confirmar la pureza e identidad.

Se extrajo ADN genómico de colonias representativas y se amplificó el gen ARNr 16S completo utilizando cebadores específicos. Los productos de PCR resultantes se analizaron, secuenciaron y alinearon con bases de datos de referencia como GenBank y SILVA para identificar las bacterias. Se construyeron árboles filogenéticos para analizar las relaciones evolutivas de los aislados. Los aislados de MOR, SIN y CHI que previamente fueron cultivados en caldo tripticosa soya se utilizaron para infectar tilapias sanas y confirmar su patogenicidad. El estudio involucró a 180 peces, divididos en cuatro grupos, cada uno inoculado con diferentes aislados bacterianos y un grupo control al que se le inyectó solución salina al 0.8%. Durante 15 días, se registraron alteraciones de comportamiento, signos clínicos y mortalidad. Al final del ensayo, se recuperaron bacterias de los peces y se identificaron mediante PCR.

El estudio identificó con éxito tres morfotipos bacterianos distintos de las muestras. Los aislados de SIN eran bacilos Gram negativos identificados como *Edwardsiella* spp. El aislado de MOR era un bacilo Gram positivo, identificado como *N. asteroides*, mientras que el aislado de CHI era un

coco Gram positivo, identificado como *S. agalactiae*. Estas identidades fueron confirmadas mediante análisis moleculares. La secuenciación del gen ARNr 16S proporcionó coincidencias de alta identidad para cada aislado con especies bacterianas conocidas. El aislado de SIN mostró una identidad del 99.63% con *E. anguillarum*, el aislado de MOR tuvo una identidad del 99.87% con *N. asteroides*, y el aislado de CHI fue 100% idéntico a *S. agalactiae*. El análisis filogenético apoyó estas identificaciones, agrupando los aislados con sus respectivas especies en los árboles evolutivos.

Las infecciones experimentales demostraron la patogenicidad de los aislados. *N. asteroides* causó un 100% de mortalidad en los peces infectados dentro de nueve días, mientras que *E. anguillarum* y *S. agalactiae* causaron una mortalidad significativa, aunque a un ritmo más lento (53 y 40 %, respectivamente). El grupo de control no mostró mortalidad, lo que confirmó la virulencia de las bacterias aisladas. El estudio destaca la importancia de la detección e identificación temprana de patógenos bacterianos en la acuicultura para prevenir brotes de enfermedades generalizadas. La identificación de *E. anguillarum*, *N. asteroides* y *S. agalactiae* como los agentes causantes de lesiones granulomatosas en tilapia representa un hallazgo significativo, ya que estos patógenos no habían sido previamente asociados con tales infecciones en la acuicultura mexicana. Este hallazgo sugiere que la acuicultura de tilapia en el país podría estar enfrentando nuevas enfermedades y desafíos, lo cual debe abordarse con cautela para prevenir potenciales pérdidas económicas.

El tercer artículo "Microbiota attached to and encapsulated by granulomas dissected from tilapia spleen: a case report" aportó resultados adicionales al objetivo uno del proyecto. Dicho producto tuvo la finalidad de describir la microbiota adherida y encapsulada por granulomas disectados del bazo de tilapia obtenidos de una granja comercial de Oaxaca, México, donde habían registrado 43% de mortalidad por granulomatosis. Las muestras fueron proveídas por el Comité Estatal de Sanidad Acuícola del Estado de Oaxaca (COSIA), quienes habían reportado inicialmente a través de pruebas bacteriológicas la sospecha de *Francisella* sp. Se analizaron muestras de lesiones granulomatosas mediante la amplificación y secuenciación de la región variable V4 del gen ARNr 16S. Se reveló una diversidad bacteriana inesperada detectando más de 20 filos bacterianos, pero solo cinco de ellos representaron el 94% de la abundancia relativa. El género *Gordonia* fue el más abundante, seguido de *Ralstonia* y *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*. *Gordonia*, perteneciente a la familia *Nocardiaceae*, ha sido detectado previamente en el intestino de tilapia y en granulomas de animales terrestres y humanos, pero esta es la primera vez que se detecta en

granulomas de peces. Estos resultados sugieren que las lesiones granulomatosas podrían proporcionar una superficie favorable para albergar una diversidad microbiana significativa, lo que plantea la posibilidad de interacciones entre el tejido granulomatoso y bacterias externas que podrían afectar la integridad de la estructura nodular. El estudio también señaló que, aunque se presumió la presencia de *Francisella* spp. en los granulomas basándose en diagnósticos tradicionales, el análisis molecular no encontró lecturas de ARNr 16S asociadas a este género, lo que sugiere una posible clasificación errónea. En su lugar, *Gordonia* podría haber sido mal identificado como *Francisella* debido a la falta de pruebas moleculares más precisas.

Estos hallazgos destacan la necesidad urgente de desarrollar modelos experimentales más comprensivos que incluyan el estudio de la microbiota externa en granulomas, así como de mejorar las herramientas de diagnóstico para diferenciar entre infecciones simples y coinfecciones. Actualmente, existen opciones limitadas para la prevención y control de infecciones granulomatosas en peces, y los modelos experimentales disponibles a menudo son inadecuados para estudiar estas enfermedades complejas.

Finalmente, el artículo en proceso de revisión que lleva por título “Metagenomic Profiling of Bacterial Granulomatous Lesions in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) from Aquaculture Systems” descrito en formato de reporte de investigación tradicional se centró en la caracterización metagenómica de lesiones granulomatosas en tilapia de granjas acuícolas en tres regiones de México: Morelos, Sinaloa y Chiapas. El objetivo del estudio fue identificar los patógenos responsables de estas infecciones bacterianas crónicas y analizar la diversidad microbiana presente en las lesiones; dicho estudio responde al objetivo específico número tres para concretar con el objetivo general del proyecto. Para ello, se recolectaron muestras de bazo de tilapias afectadas por granulomas y se realizaron análisis metagenómicos mediante secuenciación masiva de la región V4 del gen ARNr 16S. El ADN extraído de las muestras fue procesado en el Laboratorio de Referencia, Análisis y Diagnóstico en Sanidad Acuícola (LARADSA), utilizando herramientas bioinformáticas como QIIME2 para la clasificación de secuencias a nivel de variantes de secuencia de amplicón (ASV). Esto permitió una evaluación precisa de la diversidad bacteriana.

Los resultados revelaron diferencias significativas en la composición microbiana de las lesiones entre las regiones estudiadas. En Sinaloa, predominaba el filo Proteobacteria (99.88%), mientras que en Chiapas dominaba Firmicutes (98.14%). Morelos mostró una mayor diversidad microbiana, con 15 filos presentes, destacándose Proteobacteria, Actinobacteria y Firmicutes. En cuanto a

patógenos, se identificaron bacterias relevantes como *E. anguillarum* en Sinaloa, un patógeno emergente, *S. agalactiae* en Chiapas, conocido por causar infecciones en tilapia, y especies del filo Actinobacteria en Morelos, como *Mycobacterium* y *Nocardia*, patógenos asociados a infecciones crónicas en peces.

Los análisis de diversidad alfa y beta indicaron diferencias en la estructura y diversidad microbiana entre las granjas. Morelos presentó la mayor diversidad alfa, lo que podría estar relacionado con la heterogeneidad de su ambiente. En cambio, las diferencias en diversidad beta sugieren que los factores ambientales y las prácticas de manejo específicas de cada granja influyen en la composición bacteriana.

Este estudio destaca la importancia de la vigilancia sanitaria en acuacultura, ya que permite detectar patógenos emergentes y mejorar las estrategias de manejo de enfermedades. El uso de herramientas metagenómicas demostró ser fundamental para comprender la dinámica de las comunidades microbianas y contribuir al desarrollo de enfoques preventivos más efectivos, con miras a una acuacultura más sostenible y competitiva en México.

2. GRANULOMATOSIS IN FISH AQUACULTURE: A MINI REVIEW

Pablo Martínez Lara¹, Marcel Martínez Porchas¹, Teresa Gollas Galván¹ (†), Jorge Hernández López² y Glen R. Robles Porchas¹

1 Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, CIAD, Hermosillo, Mexico

2 Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, CIBNOR, Hermosillo, Mexico

Publicado el:

01 de agosto de 2020

En la revista:

Reviews in Aquaculture

DOI:

<https://doi.org/10.1111/raq.12472>

Granulomatosis in fish aquaculture: a mini review

Pablo Martínez-Lara¹, Marcel Martínez-Porchas¹ , Teresa Gollas-Galván¹ ,
Jorge Hernández-López² and Glen R. Robles-Porchas¹

¹ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, CIAD, Hermosillo, México

² Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, CIBNOR, Hermosillo, Mexico

Correspondence

Teresa Gollas-Galván, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, CIAD, A.C. Biología de Organismos Acuáticos, Carretera a La Victoria Km. 0.6, Hermosillo, Sonora 83304, México. Email: tgollas@ciad.mx

Received 26 March 2020; accepted 18 June 2020.

Abstract

Bacterial infections represent the greatest threat for fish culture, especially those causing granulomatous processes. Although there are experimental models used to elucidate the mechanisms of pathogenicity in granulomatous processes, most of these aimed to understand the infection in superior vertebrates like humans; therefore, there is still an urgent need to expand the number of infection models focused on aquaculture. Granulomatous infections are difficult to detect in early stages due to the lack of clinical signs and because these clinical signs have a great similarity to those generated by other pathogenic bacteria. Besides, there is no evidence or reports of granulomatous co-infections in aquaculture environments which is a plausible scenario either in culture systems or in the wild environment; co-infections could interfere with a correct diagnosis of any granulomatous disease, as reported for granulomatous infections in terrestrial species. This revision aims to highlight the state of the art in the knowledge of pathogenic bacteria associated with granulomatosis in fish aquaculture as well as analysing this information.

Key words: co-infections, fish, *Francisella*, granulomatous infections, *Mycobacterium*, *Nocardia*.

Introduction

Currently, about 597 aquatic animal species are belonging to different taxonomic groups that are cultivated around the world, most of which are secondary or tertiary consumers (~80%) (FAO 2016). The FAO reported total global production of 84.4 million tones of aquatic organisms in 2018 (FAO 2020), of which 45 million tones corresponded to fin-fish farming. Of the total of aquatic organisms produced worldwide by both aquaculture and fisheries, fish coming from the aquaculture industry represented up to 43%, and this has increased over the years.

Aquaculture has achieved a greater economic revolution and is considered as the fastest emerging activity worldwide in the food industry (Dadar *et al.* 2017). However, one of the most relevant threats in fish farming is the economic loss, due to outbreaks of infectious diseases causing high mortality rates. About 55% of fish infections are caused by bacteria (Dhar *et al.* 2014), because unlike the terrestrial environment, the aquatic environment favours the development of these microbes regardless of the host. Disease outbreaks in aquaculture are favoured by stocking intensification, which is a strategy to make the activity more profitable.

Diseases caused by bacteria in fish can be classified into two types, non-granulomatous and granulomatous (Pérez-Arellano & del Pozo 2013). These last ones pose a great threat to the aquaculture industry; herein, chronic and necrotizing granulomas can be caused in fish and shellfish by the genus *Francisella*, potentially leading to extensive chronic multifocal granulomatous response including multiple lesions throughout the affected organs which severely compromise the immune response of fish and ultimately its survival (Birkbeck *et al.* 2011).

Although mammals and fish show similar symptoms during these infections, the interactions between bacteria associated with granulomas formation and the underlying mechanisms of the host immune system remain unknown. The interactions are complex because different bacteria are associated with the formation of granulomatous lesions and sometimes clinical signs go unnoticed during early infection stages (Itano *et al.* 2006a; Gauthier & Rhodes 2009; Babalola 2015; Wang *et al.* 2017), making their detection a difficult task. Therefore, a variety of infection models are required not only to understand the infection mechanisms, but to develop prevention and control protocols (Wang *et al.* 2017).

The objective of this work is to carry out a review and discuss the current state of knowledge about granulomatous diseases in fish aquaculture and the most common bacteria associated with these outbreaks.

Granulomatous definition

A granuloma can be defined as a mass of granulation tissue that is regularly originated in response to microbial infections, inflammation or the presence of foreign material, and constitutes a strategy of the immune system to isolate microbes or material incapable to be eliminated. In this regard, granulomatous infections comprise a large family of pathologies exhibiting the histological denominator of granuloma formation. These can provoke acute or chronic clinical symptoms (James 2000; Alberts *et al.* 2010) caused by different factors, commonly of autoimmune or infectious origin. Granulomatous infections are characterized by a deficiency in the aetiological agent phagocytosis and are not easily controlled by other inflammatory mechanisms (Pérez-Arellano & del Pozo 2013).

Granulomas are constituted of agglomerations of heterogeneous, compact, well-organized and dynamic accumulation of immune cells, including infected and uninfected macrophages, epithelial cells and fibroblasts (Adams 1974). The phagocytosis of the foreign body is activated in the first instance, but if the process fails, the activation of T lymphocytes occurs, and these activate the macrophages or histiocytes that are the main components of the granuloma. In other words, when the cells of the immune system encounter the pathogen (including bacteria and fungi), a signalling cascade of anti- and pro-inflammatory nature is initiated. This triggers the recruitment and accumulation of macrophages and other leucocytes in tissue. Eventually, granulomas or granulomatous lesions are formed due to the complex interaction between the invading organism or prolonged antigenaemia, the activity of the macrophages, the response of Th1 cells, the hyperactivity of B cells and a wide range of biological mediators (James 2000; Myllymäki *et al.* 2018).

Granulomas can be detected as non-necrotic and necrotic granulomas. Commonly a non-necrotic granuloma is firstly formed, but it can progress to a necrotic phase. For example, Ruiz-Tagle *et al.* (2020) documented a non-necrotic granuloma consisting predominantly of lymphocytes, macrophages, giant cells and produced by mycobacteria. However, the granuloma progressed to a necrotic state registering changes in its microenvironment, macrophage apoptosis and the bacteria slowing their growth rate. The authors also reported that the lymphocyte cuff of the granuloma contained giant cells and isolated macrophages positive for the various mycobacterial genes. Necrotic granulomas usually have infectious causes but are usually not

easily detected in fish, because most of the time their formation occurs internally.

Granulomatous infections in fish

The primary route of infection by pathogens in fish occurs via injured skin and gut (Austin 1999); however, eyes, gills and other vias have been discussed. Herein, the infection routes of agents associated with granulomatous lesions such as the bacterial genera *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Francisella* and others are unknown, but it is hypothesized that this could occur through gills, muscle and other injured sites (Maekawa *et al.* 2018). This has been observed in the yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) undergoing nocardiosis infections, causing injuries in gills, dermis and muscle (Itano *et al.* 2006). Noteworthy one of the factors influencing the mortality rates when these infections occur in fish is the infection route. For example, while intradermal infections tend to progress, the mortality and spread of the disease is greater in intraperitoneal or immersion infections (Itano *et al.* 2006a). In some cases, infections do not result in disease because some bacteria, such as *Mycobacterium marinum*, have developed evasion strategies to live in balance with the immune system, remaining dormant for long periods (Babalola 2015); however, a suppressed immune system accompanied by the appearance of lesions and favourable environmental conditions could trigger the proliferation of these bacteria, leading to granulomatous disease (Reavill & Schmidt 2012); this same pattern occurs in the transmission of granulomatous disease to humans, for instance Lewis *et al.* 2003 argued that disseminated infections of *M. marinum* in fish are rare in humans but almost always occur in immunosuppressed individuals.

Regarding disease development, there is consensus about the granuloma formation when the immune system cannot eliminate the pathogen (Evensen *et al.*, 2005; Swaim *et al.* 2006). In a latent infection, for example the pathogen is still not in high concentration, which facilitates the process to encapsulate the pathogenic cells by the action of infected and non-infected macrophages, and the granuloma begins to get defined (Diamant *et al.* 2000; Myllymäki *et al.* 2016; Figure 1). If the infection persists, the invasive bacteria are highly compacted within a defined core and surrounded by a thick fibrous capsule that maintains the pathogen in isolation; at this point, granulomas can be observed by the naked eye in different tissues. Finally, after a chronic infection, the reactivation and rapid replication of the encapsulated bacteria cause an overflow from the granuloma while bacteria disseminate, causing even more damage to the tissue and ultimately leading to death (Figure 2). For instance, this process has been observed in zebrafish infected with *Mycobacterium marinum*, which was used as a model to understand the tuberculosis disease in humans

Granuloma formation

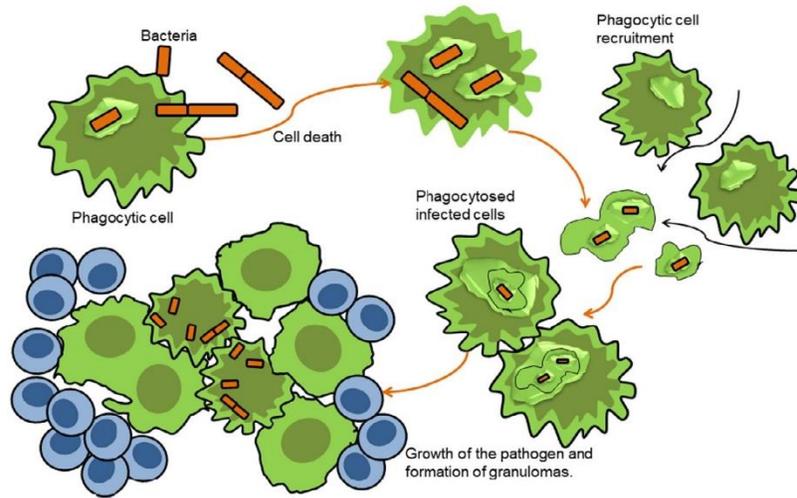


Figure 1 Basic granuloma formation. Bacteria such as *M. marinum* within phagocytic cells of zebrafish eventually trigger cell death. Infected cells recruit uninfected cells, and the latter engulf the infected cells. This provides a favourable niche or environment for the growth of the bacteria and allows the exit of infected cells to form new granulomas. Based on Davis and Ramakrishnan (2009).

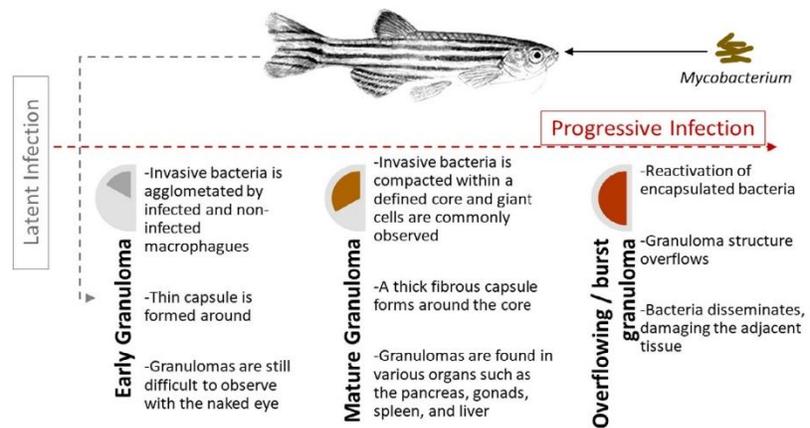


Figure 2 General scheme of granuloma formation in zebrafish infected with *Mycobacterium*.

because this species resembles the lesions caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Myllymäki *et al.* 2016).

The most common bacteria associated with fish granulomatous infections belong to the genera *Mycobacteria* spp., *Nocardia* spp. and *Francisella* spp. (Pérez-Arellano & del Pozo 2013). These bacteria have been subject to further study, identified and used in experimental models to explain the underlying mechanisms in granulomatous processes; however, other bacteria apart of these can be also found in literature as etiological agents of granulomatous diseases (Table 1); for example, *Lactococcus garvieae*, which is associated with fatal haemorrhagic septicaemia in farmed rainbow trout (Shahi *et al.* 2018), can also produce spleen granulomas while inducing antibody response by both IgM (+) and IgT (+) spleen B cells (Castro *et al.* 2019).

Finally, granulomatous infection in fish is not only relevant from the economic perspective or the ecological point of view in the case of open fish farms, but also the human health standpoint, because some of these pathogens can be transmitted from fish to humans (Kern *et al.* 1989; Hashish *et al.* 2018).

Mycobacterium spp.

Mycobacteria belong to the genus *Mycobacterium* (Order: *Actinomycetales*, suborder: *Corynebacterineae*, family: *Mycobacteriaceae*), and these are pleomorphic, non-spore forming, Gram-positive and aerobic bacteria, without motility in the form of bacilli, measuring 0.2–0.6 µm in diameter and 1–10 µm in length. These microbes have a unique cell wall that includes a long chain (60–90 carbons)

Table 1 Granulomatous infections caused by bacteria belonging to different taxonomic groups in diverse marine and freshwater fish species

Bacteria	Aquatic animal	Evaluated response	Reference
<i>Edwardsiella tarda</i>	West African lungfish (<i>Protopterus annectens</i>)	External ulcerative lesions and mortality after developing anorexia. Multifocal areas of necrosis and heterophilic and histiocytic inflammation in multiple tissues. Small numbers of intra- and extracellular monomorphic Gram-negative rod-shaped bacilli. Lung granuloma, kidney and testes showed heterophilic inflammation with phagocytosis of small monomorphic bacilli and some heterophils exhibiting cytoplasmic projections suggesting heterophil extracellular traps	Rousselet et al. (2018)
<i>Francisella marina</i> sp. nov.	Spotted Rose Snapper (<i>Lutjanus guttatus</i>)	Multifocal granulomatous lesions with small, pleomorphic coccobacilli predominantly in the peritoneum, spleen, kidneys, liver, pancreas, intestine and heart	Soto et al. (2018)
<i>Francisella noatunensis</i> subsp. <i>orientalis</i>	Nile tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i> x <i>O. aureus</i>) Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	Numerous white granulomas in kidney, liver, heart and spleen. Head kidney and spleen were markedly swollen	Lin et al. (2016)
	Tilapia (<i>Oreochromis</i> sp.)	Granuloma-like structures containing small coccoid bacteria detected in the spleen. Some encapsulated granulomas were also observed even in previously immunized fish	Lagos et al. (2017)
<i>Lactococcus garvieae</i>	Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Reduced appetite, lethargy, dark pigmentation and abnormal distension before death. Necropsy showed widespread of white multifocal nodules in the head kidney, spleen, liver and gill. Histopathology revealed granulomatous inflammation surrounded by numerous macrophages	Pulpiat et al. (2019)
<i>Mycobacterium marinum</i>	Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	Haemorrhagic septicaemia was associated with this pathogen. Extensive degenerative and inflammatory changes in eye, kidney, gill and liver were observed.	Shahi et al. (2018)
<i>Mycobacterium leprae</i>	Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	This approach demonstrated that the zebrafish granuloma contains foam cells and the transdifferentiation of macrophages into foam cells is driven by the mycobacterial ESX1 pathogenicity locus	Johansen et al. (2018)
		Rapid development of noncaseating granulomas, but infection was eventually eradicated. The rag1 mutant zebrafish lacking lymphocytes also formed noncaseating granulomas, but these controlled the infection more slowly. These results revealed the interplay between innate and adaptive immune determinants mediating leprosy granuloma formation and function	Madigan et al. (2017)
<i>Mycobacterium gordonae</i>	Ginbuna crucian carp (<i>Carassius auratus langsdorfii</i>)	Granulomatous responses consisted of central macrophage accumulation and surrounding lymphocytes. Ziehl-Neelsen-positive bacteria were detected in the trunk kidney of fish. The marginal lymphocytes were positive for CD4-1, and the IFN γ -producing cells surrounded the mycobacterial cell-laden phagocytes. CD4-1+ cells and IFN γ 2 played important roles in the granulomatous inflammation	Kato et al. (2019)
<i>Nocardia seriolae</i>	Spotted butterflyfish (<i>Scatophagus argus</i> , Linn)	Enlargement of spleen, kidney and liver with white nodules varying in size. The pathogen caused systemic granulomas	Wang et al. (2014)
	Snubnose pompano (<i>Trachinotus blochii</i>)	Fish displayed paleness and lethargy, and exhibited skin haemorrhages and ulcers. Prominent white nodules varying in size were observed in the spleen, kidney and liver. Typical granulomatous lesions in these organs were observed	Vu-Khac et al. (2016)
	Tiger barb (<i>Puntius tetrazona</i>)	Green fluorescent protein-labelled <i>Nocardia seriolae</i> strain was injected in fish. Bacteria were phagocytized by leucocytes and proliferated within these cells, which in turn led to leucocyte aggregation, leucocyte death and granuloma formation. Bacteria could permanently colonize various tissues via leucocyte circulation, causing multi-organ infection	Wang et al. (2017)
	Japanese eel (<i>Anguilla japonica</i>)	Infected fish exhibited lethargy and skin ulcers. Pathogen genome was sequenced and assembled, revealing dozens of antibiotic resistance genes in the genome of <i>N. seriolae</i> strains; most of the antibiotics were involved in the inhibition of the biosynthesis of proteins or cell walls	Han et al. (2018)
<i>Streptococcus iniae</i>	Tilapia (<i>Oreochromis aureus</i>)	External signs included exophthalmia and cachexia, while internal signs were granulomatous septicaemia and interstitial nephritis, among others	Ortega et al. (2018)

of 3-hydroxy mycolic acid (Draper 1971; Gangadharam & Jenkins 1997). According to the Runyon classification scheme (1959), *Mycobacteria*, except for those species that cannot be cultivated *in vitro*, are functionally separated by growth time.

The genus *Mycobacterium* causes Mycobacteriosis (Gauthier & Rhodes 2009), which can affect humans, fish and other animals (Jacobs *et al.* 2009). It is a chronic disease that may not present symptoms and can be detected in cultured marine and freshwater fish (Novotny *et al.* 2010). The associated species with mycobacteriosis in either freshwater and marine fish are *M. marinum*, *M. salmoniphilum*, *M. fortuitum*, *M. shimoidei*, *M. chelonae*, *M. triplex*, *M. montefiorensis* and *M. abscessus* (Gauthier & Rhodes 2009). Moreover, different non-tuberculous *Mycobacterium* species can cause co-infections in fish, even those associated with distant taxonomic groups; for example, *M. shimoidei*, *M. marinum*, *M. chelonae*, *M. septicum*, *M. peregrinum* and *M. porcinum* were isolated from the exotic goldfish Guppy in South Africa (Geebe *et al.* 2018).

Mycobacterium affects all tissues including eyes, gills, visceral organs, muscles and scales. The external symptoms are not specific and may display loss of scales, skin ulcerations, changes in pigmentation, abnormal behaviour and spine malformations among other signs (Nigrelli & Vogel 1963; Ross 1970). The most severe signs include the enlargement of spleen, kidneys and liver, with the presence of white or grey nodules in internal organs.

Mycobacteriosis is also referred as piscine tuberculosis in both, human and fish; although not all *Mycobacterium* species are tuberculous and the disease is not associated with high mortality rates in fish caught by fisheries, it is associated with significant losses within aquaculture (Gauthier & Rhodes 2009) due to poor growth, lower survival and poor productive response in general. Mycobacteriosis seems to be a universal disease among the most different taxonomic classes of these vertebrates, with the aggravating circumstance that this genus easily generates resistance to antibiotics (Gauthier & Rhodes 2009).

Granulomatous infections in aquaculture could have severe impacts, because the cultured organisms are confined in high densities and are exposed to other acute and chronic stressors that could affect the immune system, making fish vulnerable to the disease.

The latency is one of the most important pathogenic aspects of the genus *Mycobacterium* and other bacteria that cause granulomatosis. *Mycobacterium marinum* has been reported as a pathogen not only able to remain dormant for years; however, when reactivated acts as a modulator of signalling pathways directed to cell death, promoting the dissemination and transmission of the bacteria (Myllymäki *et al.* 2016; Vemula *et al.* 2016). This bacterial capacity

turns out to be relevant because it could be extrapolated to fish aquaculture.

The *Mycobacterium* genus has species that able to introduce, survive and even replicate in macrophages (Barker *et al.* 1997; Tobin & Ramakrishnan 2008), which is relevant to understand how this pathogen can adapt to evade the immune system. In this regard, evidence suggests that *Mycobacterium* can use the host's macrophages and granulomas for its benefits, enhancing its expansion and dissemination (Volkman *et al.* 2010; Oksanen *et al.* 2013); as this process goes on, the pathogenic bacteria recruit new uninfected macrophages to the granuloma where these macrophages phagocytize infected dead cells and thus promoting the dissemination of the bacteria. Preventive strategies include DNA-based vaccines containing *Mycobacterium* antigens (Oksanen *et al.* 2013).

Nocardia spp.

Members of the *Nocardia* genus are Gram-positive, aerobic actinomycetes, motility-free, acid-alcohol-resistant bacteria in the form of pleomorphic bacilli (Luo *et al.* 2014). The genus contains more than 90 species recognized and widely distributed in aquatic and terrestrial habitats. Most of these species are known to cause nocardiosis in fish and a wide variety of animals including humans (Kandi 2015). *Nocardia* is considered a genus harbouring a group of pathogens with unique attributes and complicated properties (Mehta & Shamoo 2020). In this regard, *Nocardia* is clinically challenging to diagnose and treat. In humans, for example (also assumed in fish), *Nocardia* can survive as facultative intracellular parasites within macrophages and escape from being eliminated by neutrophils and monocytes. Infections can be asymptomatic and, combined with the slow growth rate of *Nocardia*, make them difficult to identify in clinical specimens. Four species of *Nocardia* have been commonly isolated from fish suffering from nocardiosis: *N. asteroides*, *N. seriolae*, *N. salmonicida* and *N. crassostreae* (Itano *et al.* 2006c).

Nocardiosis is considered a chronic, granulomatous and systemic disease where the lesions are localized in the skin and several internal organs including kidney, liver and spleen, with the typical nodular structure of granuloma formation. Observable symptoms usually do not manifest during the early stages of fish, but the invasion of tissue occurs gradually. This is the reason why nocardiosis is not rapidly detected in aquaculture until the mid-anaphase of breeding, resulting in economic losses for breeders (Wang *et al.* 2007; Elkesh *et al.* 2013).

Nocardia sp. infects a variety of fish around the world, including the Atlantic salmon (*Salmo salar*), the African catfish (*Clarias gariepinus*), the Snubnose pompano (*Trachinotus blochii*) (Bransden *et al.* 2000; Vu-Khac *et al.*

2016), the Transparent Tiger barb (*Puntius tetrazona*) (Wang *et al.* 2017), the Large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) and the Largemouth Bass (*Micropterus salmoides*) (Chen *et al.* 2000; Wang *et al.* 2005), among several others. It is considered an opportunistic pathogenic bacterium infecting immunocompromised or injured fish (Wang *et al.* 2017).

With the increase in the intensification of culture methods in aquaculture, fish become more susceptible of being weakened by stress or physical injury. Although nocardiosis is increasing in cultured fish, pathogenesis and spread mechanisms are still poorly understood; however, these organisms can be latent in the environment and proliferating only when fish present accessible injuries (Miyoshi *et al.* 2019).

As described above, there are no methods for the early detection or control within infected populations. The genus is still an enigma in several ways; for this reason, *Nocardia* infections are difficult to identify and treat even in humans, in which most of the research has been focused (Mehta & Shamoo 2020). However, *Nocardia* sp. is phylogenetically related to *Mycobacterium* sp. (Shah *et al.* 2017) and the infectious lesions are also similar; therefore, these two genera may have similar infection mechanisms. In this regard, studies of genomic and transcriptomic sequence analysis (Imajoh *et al.* 2015; Xia *et al.* 2015a,b; Byadgi *et al.* 2016) as well as the development of vaccines and even experimental models (Itano *et al.* 2006b; Nayak & Nakanishi 2016) could provide relevant information to establish prevention and eradication measures to avoid *Nocardia* sp. infections while methods for early detection are developed (Maekawa *et al.* 2018).

Also, antigen markers of *Nocardia* species have not been studied as extensive; therefore, developing effective vaccines against fish nocardiosis is still a pending issue. In this regard, Chen *et al.* (2019) evaluated the antigenicity of whole-cell protein of three pathogenic *Nocardia* spp., and seven common immunogenic proteins were identified including molecular chaperone DnaK, 30 S ribosomal protein S1, molecular chaperone GroEL, FHA domain-containing protein, TerD family protein, 50 S ribosomal protein L7/L12 and PspA/IM30 family protein. From these, a DNA vaccine encoding the FHA gene against fish nocardiosis was developed showing promising results for the hybrid snakehead challenged with *N. seriolae*. Other DNA vaccines encoding ribosomal proteins (RpL and RpsA) have been developed and successfully tested against *Nocardia seriolae* infection in fish (Chen *et al.* 2020).

Francisella spp.

Francisella genus contains Gram-negative pleomorphic bacteria without motility (0.1–1.5 µm), and these are

intracellular organisms some of which are strict aerobes while others may be facultative. However, this genus was first considered as a Rickettsia-like or Piscirickettsia-like organism (Chen *et al.* 1994; Colquhoun & Duodu 2011), but the pathogen was later confirmed as a γ -Proteobacteria in the family Francisellaceae, order Thiotrichales (Birkbeck *et al.* 2011). The genus also contains species that can cause disease to a wide range of hosts, including humans; the species that mostly affects fish include *Francisella asiatica* and *Francisella noatunensis* (Mikalsen *et al.* 2007), and two subspecies have been isolated from the last one, *F. noatunensis* subsp. *orientalis* which causes disease in fish of temperate climates including tilapia (*Oreochromis niloticus*), and *F. noatunensis* subsp. *noatunensis* which affects fish thriving in icy waters, such as the Atlantic salmon (*Salmo salar*) (Birkbeck *et al.* 2011).

Francisellosis is, therefore, a bacterial disease that mostly occurs in juvenile fish during winter months; according to Chong (2016), for tilapia, epizootics typically occur in cooler winter water temperatures with higher mortalities at 15°C than 30°C; while for the Atlantic cod, Francisellosis causes more mortalities as water temperatures increase towards 20°C. This disease provoked economic impacts in the culture of tilapia and Atlantic cod since registering the first cases three decades ago (Chong 2016); herein, the mortality rate of infected fish depends upon several factors; however, the Atlantic salmon undergoing francisellosis registered mortality of 20%, while mortality of 95% was reported for tilapia (Chern & Chao 1994; Ostland *et al.* 2006). Several *Francisella* species can be transmitted by direct contact between infected animals, through contaminated water or food, or by vectors (Colquhoun & Duodu 2011).

The main clinical signs observed in diseased tilapia are exophthalmia, erratic swimming, anorexia, ascites, skin ulcers at the base of the fins and pale gills. At the necropsy, multifocal granulomatous lesions are observed in kidney, spleen, and liver (Colquhoun & Duodu 2011; Soto *et al.* 2012; Leal *et al.* 2014; Assis *et al.* 2017). Extensive granulomatous inflammation with multiple granulomas (some liquid-filled) can be observed, and the granulomas are usually formed by hypertrophied foamy macrophages, fibroblasts and leucocytes, and in some cases with necrotic core (Colquhoun & Duodu 2011).

Several methods have been used for the diagnosis of *F. noatunensis* subsp. *orientalis* in diseased fish such as histopathology, PCR and bacteriological culture (Soto *et al.* 2010). The affected organs of fish present granulomas consisting of vacuolated macrophages with the *Francisella* cells, central necrosis and fibrous encapsulation (Camus *et al.* 2013).

Despite bacteriological culture is considered as the gold standard method for detection of *F. noatunensis* subsp.

orientalis (Colquhoun & Duodu 2011) studies are demonstrating that the use of real-time PCR (qPCR) in tilapia experimentally infected, has greater sensitivity and similar specificity (>99.2%) than bacteriological culture (Assis *et al.* 2017). However, there is scarce information about the detection of other species of the *Francisella* genus or the identification of these infections in other fish. Besides, there is no commercial vaccine for francisellosis, but several reports are documenting promising results for vaccines developed using outer membrane vesicles of the pathogen (Brudal *et al.* 2015) or inclusively mutants of *F. asiatica* as a live attenuated vaccine (Soto *et al.* 2011) that could serve as francisellosis regulator.

Co-infections

Co-infections in aquatic animals have received scarce attention despite these are more likely to occur either in aquaculture systems or in nature. Co-infections are caused by two or more genetically different pathogens, where each pathogen leads to different effects including harm to the host in syndemism with other pathogens (Cox 2001; Bakletz 2004).

Most of the literature addresses single infections, classifying the other agent as opportunistic and mostly ignoring it (Kotob *et al.* 2017). However, once a host is infected and undergoing the disease, it is susceptible to the invasion of other pathogenic microbes aggravating its circumstance.

During co-infections, interactions occur between the infectious agents and the outcome will depend on the load of one or different pathogens, and even at this level, the competition among pathogens can occur, or not (Cox 2001). Natural environments in which animals thrive are diverse with a wide variety of heterogeneous micro-organisms including parasitic and non-parasitic species where co-infections are frequent. Currently, there is scarce information on granulomatous co-infections in aquatic environments; for example, a case report revealed that not all fish undergoing granulomatous disease present co-infection, and different co-infection (*Brevoortia tyrannus*) patterns may occur within the same population. Herein, a group of Atlantic menhaden undergoing granulomatosis registered not only three species of mycobacteria in spleen (*M. marinum*, *M. fortuitum* complex, and *M. gordonae*) (Stine *et al.* 2005), but also a 40% co-infection rate of *Mycobacterium* spp. and *Vibrio hollisae* was detected, while in other specimens also undergoing mycobacteriosis, *Photobacterium damsela* was isolated from the kidney, liver or brain; furthermore, another group of the same fish registered the three pathogens including *Mycobacterium* spp., *Vibrio hollisae* and *P. damsela*. It could be hypothesized that some granulomatous infections in aquaculture could be co-infections, considering the large percentage of non-culture

bacteria in the aquatic environment that may go undetected or have not yet been studied (Martínez-Porchas & Vargas-Albores 2017). Such scenarios may cause simultaneous infections interfering with the correct diagnosis of any granulomatous disease as reported for bovine tuberculosis (Barry *et al.* 2011). Therefore, research about the interactions occurring between these species during mixed infections and the deleterious effects of multi-infections on fish disease pathogenesis, prognosis and treatment is required (Griffiths *et al.* 2011; Johnson & Hoverman 2012; Eswarappa *et al.*, 2012; Kotob *et al.* 2017).

Perspectives and conclusions

Currently, most of the existing experimental models only explain certain mechanisms of pathogenicity to extrapolate it to human diseases, such as tuberculosis and losing focus towards aquaculture. The few fish models are limited by poor susceptibility to certain pathogens or low reproducibility of the pathogenesis, and results display significant differences in their responses between models. Although some of them are already studying specific granulomatous diseases, there is an urgent need to expand the number of available and suitable models to explain not only specific immunological mechanisms of action but also to produce vaccines, develop prevention, and epidemiological control. New studies should focus on understanding how different species of bacteria induce granuloma lesions under aquaculture conditions (high-density growth, stress) in different experimental models and development of early detection methods especially if those models contain a great commercial interest for human consumption. Until now, the combined information from recent studies of vaccine development, molecular methods such as genomic and transcriptomic sequencing analysis could provide some protection against these diseases.

References

- Adams DO (1974) The structure of mononuclear phagocytes differentiating in vivo: I. Sequential fine and histologic studies of the effect of Bacillus Calmette-Guerin (BCG). *The American Journal of Pathology* **76**: 17–48.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K *et al.* (2010) *Biologia molecular da célula*. Artmed Editora, Porto Alegre, Brasil.
- Assis GBN, de Oliveira TF, Gardner IA, Figueiredo HCP, Leal CAG (2017) Sensitivity and specificity of real-time PCR and bacteriological culture for francisellosis in farm-raised Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Journal of Fish Diseases* **40**: 785–795.
- Austin B (1999) Emerging bacterial fish pathogens. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **19**: 231–234.

- Babalola MO (2015) The strengths, weaknesses, opportunities and threats (SWOT) analysis of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *Journal of Tuberculosis Research* **3**: 184.
- Bakaletz LO (2004) Developing animal models for polymicrobial diseases. *Nature Reviews Microbiology* **2**: 552–568.
- Barker LP, George KM, Falkow S, Small PL (1997) Differential trafficking of live and dead *Mycobacterium marinum* organisms in macrophages. *Infection and Immunity* **65**: 1497–1504.
- Barry C, Corbett D, Bakker D, Andersen P, McNair J, Strain S (2011) The effect of *Mycobacterium avium* complex infections on routine *Mycobacterium bovis* diagnostic tests. *Veterinary Medicine International* **2011**: 1–7.
- Birkbeck TH, Feist SW, Verner-Jeffreys DW (2011) Francisella infections in fish and shellfish. *Journal of Fish Diseases* **34**: 173–187.
- Brandsen MP, Carson J, Munday BL, Handlinger JH, Carter CG, Nowak BF (2000) Nocardiosis in tank-reared Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* **23**: 83–85.
- Brudal E, Lampe EO, Reubsaet L, Roos N, Hegna IK, Thrane IM *et al.* (2015) Vaccination with outer membrane vesicles from *Francisella noatunensis* reduces development of francisellosis in a zebrafish model. *Fish & Shellfish Immunology* **42**: 50–57.
- Byadgi O, Chen C-W, Wang P-C, Tsai M-A, Chen S-C (2016) De novo transcriptome analysis of differential functional gene expression in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) after challenge with *Nocardia seriolae*. *International Journal of Molecular Sciences* **17**: 1315.
- Camus AC, Dill JA, McDermott AJ, Clauss TM, Berliner AL, Boylan SM *et al.* (2013) *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* infection in Indo-Pacific reef fish entering the United States through the ornamental fish trade. *Journal of Fish Diseases* **36**: 681–684.
- Castro R, Coll J, del Mar Blanco M, Rodriguez-Bertos A, Jouneau L, Fernández-Garayzabal JF *et al.* (2019) Spleen and head kidney differential gene expression patterns in trout infected with *Lactococcus garvieae* correlate with spleen granulomas. *Veterinary Research* **50**: 32.
- Chen S-c, Tung M-c, Chen S-p, Tsai J-f, Wang P-c, Chen R-s *et al.* (1994) Systematic granulomas caused by a rickettsia-like organism in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), from southern Taiwan. *Journal of Fish Diseases* **17**: 591–599.
- Chen SC, Lee JL, Lai CC, Gu YW, Wang CT, Chang HY *et al.* (2000) Nocardiosis in sea bass, *Lateolabrax japonicus*, in Taiwan. *Journal of Fish Diseases* **23**: 299–307.
- Chen J, Tan W, Wang W, Hou S, Chen G, Xia L *et al.* (2019) Identification of common antigens of three pathogenic *Nocardia* species and development of DNA vaccine against fish nocardiosis. *Fish & Shellfish Immunology* **95**: 357–367.
- Chen J, Chen Z, Wang W, Hou S, Cai J, Xia L *et al.* (2020) Development of DNA vaccines encoding ribosomal proteins (RpL and RpsA) against *Nocardia seriolae* infection in fish. *Fish & Shellfish Immunology* **96**: 201–212.
- Chern RS, Chao B (1994) Outbreaks of a disease caused by rickettsia-like organism in cultured tilapias in Taiwan. *Fish Pathology* **29**: 61–71.
- Chong R (2016) Francisellosis in fish: an emerging challenge. *Microbiology Australia* **37**: 112–114.
- Colquhoun DJ, Duodu S (2011) *Francisella* infections in farmed and wild aquatic organisms. *Veterinary Research* **42**: 47.
- Cox FEG (2001) Concomitant infections, parasites and immune responses. *Parasitology* **122**: S23–S38.
- Dadar M, Dhama K, Vakharia VN, Hoseinifar SH, Karthik K, Tiwari R *et al.* (2017) Advances in aquaculture vaccines against fish pathogens: global status and current trends. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* **25**: 184–217.
- Davis JM, Ramakrishnan L (2009) The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. *Cell* **136**: 37–49.
- Dhar AK, Manna SK, Allnut FCT (2014) Viral vaccines for farmed finfish. *Virusdisease* **25**: 1–17.
- Diamant A, Banet A, Ucko M, Colorni A, Knibb W, Kvitt H (2000) Mycobacteriosis in wild rabbitfish *Siganus rivulatus* associated with cage farming in the Gulf of Eilat, Red Sea. *Diseases of Aquatic Organisms* **39**: 211–219.
- Draper P (1971) The walls of *Mycobacterium lepraemurium*: chemistry and ultrastructure. *Microbiology* **69**: 313–324.
- Elkesh A, Kantham KPL, Shinn AP, Crumlish M, Richards RH (2013) Systemic nocardiosis in a Mediterranean population of cultured meagre, *Argyrosomus regius* Asso (Perciformes: Sciaenidae). *Journal of Fish Diseases* **36**: 141–149.
- Eswarappa SM, Estrela S, Brown SP (2012) Within-host dynamics of multi-species infections: facilitation, competition and virulence. *PLoS One* **7**: e38730.
- Evensen Ø, Brudeseth B, Mutoloki S (2005) Inflammatory processes in fish. In: *Progress in Fish Vaccinology: Proceedings of the 3rd International Symposium on Progress in Fish Vaccinology, the Grieg Music Hall Conference Centre, Bergen, Norway: April 9–11, 2003*. S Karger Ag, pp. 117–125.
- FAO (2020) *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in Action*. FAO, Rome, Italy.
- FAO FaOotUN (2016) *Papel de la FAO en la acuicultura. Food and agriculture organization of the uniter nations*. FAO, Rome, Italy.
- Gangadharam PRJ, Jenkins PA (1997) *Mycobacteria: I Basic Aspects*. Springer Science & Business Media, New York City, NY.
- Gauthier DT, Rhodes MW (2009) Mycobacteriosis in fishes: a review. *The Veterinary Journal* **180**: 33–47.
- Gcebe N, Michel AL, Hlokwé TM (2018) Non-tuberculous *Mycobacterium* species causing mycobacteriosis in farmed aquatic animals of South Africa. *BMC Microbiology* **18**: 32.
- Griffiths EC, Pedersen AB, Fenton A, Petchey OL (2011) The nature and consequences of coinfection in humans. *Journal of Infection* **63**: 200–206.
- Han HJ, Kwak MJ, Ha SM, Yang SJ, Kim JD, Cho KH *et al.* (2018) Genomic characterization of *Nocardia seriolae* strains isolated from diseased fish. *Microbiology Open* **8**: e00656.
- Hashish E, Merwad M, Elgaml S, Amer A, Kamal H, Elsadek A *et al.* (2018) Mycobacterium marinum infection in fish and man: epidemiology, pathophysiology and management; a

- review. *Veterinary Quarterly* **38**: 35–46. <https://doi.org/10.1080/01652176.2018.1447171>
- Imajoh M, Fukumoto Y, Yamane J, Sukeda M, Shimizu M, Ohnishi K *et al.* (2015) Draft genome sequence of *Nocardia seriolae* strain N-2927 (NBRC 110360), isolated as the causal agent of nocardiosis of yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) in Kochi Prefecture, Japan. *Genome Announc* **3**: e00082-00015.
- Itano T, Kawakami H, Kono T, Saki M (2006) Experimental induction of nocardiosis in yellowtail, *Seriola quinqueradiata* Temminck & Schlegel by artificial challenge. *Journal of Fish Diseases* **29**: 529–534.
- Itano T, Kawakami H, Kono T, Sakai M (2006a) Experimental induction of nocardiosis in yellowtail, *Seriola quinqueradiata* Temminck & Schlegel by artificial challenge. *Journal of Fish Diseases* **29**: 529–534.
- Itano T, Kawakami H, Kono T, Sakai M (2006b) Live vaccine trials against nocardiosis in yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Aquaculture* **261**: 1175–1180.
- Itano T, Kawakami H, Kono T, Sakai M (2006c) Detection of fish nocardiosis by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Applied Microbiology* **100**: 1381–1387.
- Jacobs JM, Stine CB, Baya AM, Kent ML (2009) A review of mycobacteriosis in marine fish. *Journal of Fish Diseases* **32**: 119–130.
- James DG (2000) A clinicopathological classification of granulomatous disorders. *Postgraduate Medical Journal* **76**: 457–465.
- Johansen MD, Kasparian JA, Hortle E, Britton WJ, Purdie AC, Oehlers SH (2018) *Mycobacterium marinum* infection drives foam cell differentiation in zebrafish infection models. *Developmental & Comparative Immunology* **88**: 169–172.
- Johnson PTJ, Hoverman JT (2012) Parasite diversity and coinfection determine pathogen infection success and host fitness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 9006–9011.
- Kandi V (2015) Human nocardia infections: a review of pulmonary nocardiosis. *Cureus* **7**: e304.
- Kato G, Kakazu T, Yamada M, Lau L-m, Nakajima K, Sato S *et al.* (2019) Granulomatous inflammation in ginbuna crucian carp *Carassius auratus langsdorffii* against *Mycobacterium goodii*. *Developmental & Comparative Immunology* **91**: 93–100.
- Kern W, Vanek E, Jungbluth H (1989) Fish breeder granuloma: infection caused by *Mycobacterium marinum* and other atypical mycobacteria in the human. Analysis of 8 cases and review of the literature. *Medizinische Klinik (Munich, Germany)* **1983**: 578–583.
- Kotob MH, Simon M-L, Kumar G, Abdelzaher M, El-Matbouli M (2017) The impact of co-infections on fish: a review. *Veterinary Research* **47**: 98.
- Lagos L, Tandberg JI, Becker MI, Winther-Larsen HC (2017) Immunomodulatory properties of *Concholepas concholepas* hemocyanin against francisellosis in a zebrafish model. *Fish & Shellfish Immunology* **67**: 571–574.
- Leal CAG, Tavares GC, Figueiredo HCP (2014) Outbreaks and genetic diversity of *Francisella noatunensis* subsp *orientalis* isolated from farm-raised Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Brazil. *Genetics and Molecular Research* **13**: 5704–5712.
- Lewis FM, Marsh BJ, von Reyn CF (2003) Fish tank exposure and cutaneous infections due to *Mycobacterium marinum*: tuberculin skin testing, treatment, and prevention. *Clinical Infectious Diseases* **37**: 390–397.
- Lin Q, Li N, Fu X, Hu Q, Chang O, Liu L *et al.* (2016) An outbreak of granulomatous inflammation associated with *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in farmed tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) in China. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* **34**: 460–466.
- Luo Q, Hiessl S, Steinbüchel A (2014) Functional diversity of *Nocardia* in metabolism. *Environmental microbiology* **16**: 29–48.
- Madigan CA, Cameron J, Ramakrishnan L (2017) A zebrafish model of *Mycobacterium leprae* granulomatous infection. *The Journal of Infectious Diseases* **216**: 776–779.
- Maekawa S, Yoshida T, Wang PC, Chen SC (2018) Current knowledge of nocardiosis in teleost fish. *Journal of Fish Diseases* **41**: 413–419.
- Martínez-Porchas M, Vargas-Albores F (2017) Microbial metagenomics in aquaculture: a potential tool for a deeper insight into the activity. *Reviews in Aquaculture* **9**: 42–56.
- Mehta HH, Shamooy Y (2020) Pathogenic *Nocardia*: a diverse genus of emerging pathogens or just poorly recognized? *PLoS Path* **16**: e1008280.
- Mikalsen J, Olsen AB, Tengs T, Colquhoun DJ (2007) *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* subsp. nov., isolated from farmed Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**: 1960–1965.
- Miyoshi Y, Fukuda Y, Ogawa K (2019) Skin injuries contribute to Nocardiosis in Japanese Amberjack *Seriola quinqueradiata*. *Fish Pathology* **54**: 64–67.
- Myllymäki H, Bäuerlein CA, Rämetsä M (2016) The zebrafish breathes new life into the study of tuberculosis. *Frontiers in Immunology* **7**: 196.
- Myllymäki H, Niskanen M, Luukinen H, Parikka M, Rämetsä M (2018) Identification of protective postexposure mycobacterial vaccine antigens using an immunosuppression-based reactivation model in the zebrafish. *Disease Models & Mechanisms* **11**: dmm033175.
- Nayak SK, Nakanishi T (2016) Development of vaccines against nocardiosis in fishes. In: Thomas S (ed) *Vaccine Design. Methods in Molecular Biology*, Vol **1404**, pp. 193–201. Humana Press, New York, NY.
- Nigrelli RF, Vogel H (1963) Spontaneous tuberculosis in fishes and in other cold-blooded vertebrates with special reference to *Mycobacterium fortuitum* Cruz from fish and human lesions. *Zoologica* **48**: 131–143.
- Novotny L, Halouzka R, Matlova L, Vavra O, Bartosova L, Slany M *et al.* (2010) Morphology and distribution of granulomatous inflammation in freshwater ornamental fish infected with mycobacteria. *Journal of Fish Diseases* **33**: 947–955.
- Oksanen KE, Halfpenny NJA, Sherwood E, Harjula S-KE, Hammarén MM, Ahava MJ *et al.* (2013) An adult zebrafish model

3. FIRST IDENTIFICATION OF PATHOGENIC *Edwardsiella anguilarum*, *Nocardia asteroides*, AND *Streptococcus agalactiae* IN TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) FARMED IN MEXICO

Pablo Martínez Lara¹, Jorge Hernández López², Francisco Vargas-Albores¹, Gloria Yepiz-Plascencia¹, Teresa Gollas Galván¹ (†), Marcel Martínez Porchas¹, Rigoberto Montes Vara³ y Daniel E. Coronado Molina²

1 Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, CIAD, Hermosillo, Mexico

2 Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, CIBNOR, Hermosillo, Mexico

3 Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, ISSSTE, Morelos, México

Enviado:

01 de Julio de 2024

A la revista:

Microbial Pathogenesis

Microbial Pathogenesis

First identification of pathogenic *Edwardsiella anguillarum*, *Nocardia asteroides*, and *Streptococcus agalactiae* in tilapia (*Oreochromis niloticus*) farmed in Mexico

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	YMPAT-D-24-01943
Article Type:	Research Article
Keywords:	<i>Edwardsiella anguillarum</i> ; <i>Nocardia asteroides</i> ; <i>Streptococcus agalactiae</i> ; tilapia; emerging disease
Corresponding Author:	Marcel Martínez-Porchas Centre for Food Research and Development MEXICO
First Author:	Pablo Martínez-Lara
Order of Authors:	Pablo Martínez-Lara Jorge Hernández-López Francisco Vargas-Albores Gloria Yepiz-Plascencia Teresa Gollas-Galván Marcel Martínez-Porchas Rigoberto Montes-Vara Daniel Coronado-Molina
Abstract:	<p>Three different bacteria strains of the <i>Nocardia</i>, <i>Edwardsiella</i>, and <i>Streptococcus</i> genera were isolated from tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) cultivated in Mexican farms with reports of granulomatous disease and mortality. The isolates were obtained from the tilapia spleen and characterized by biochemical tests, real-time PCR, and 16S rRNA sequencing. Comparisons with the GenBank Database indicated a 99.63% and 99.87% sequence identity to the 16S rRNA of the isolated samples with <i>Edwardsiella anguillarum</i> and <i>Nocardia asteroides</i>, respectively, and 100% to <i>Streptococcus agalactiae</i>. The pathogenicity of these bacteria was confirmed in a bioassay challenge by intraperitoneally injecting healthy adults of tilapia. The infected tilapia displayed characteristics of pathological processes such as lethargy, erratic swimming, darkening of skin, and death. High mortalities were observed the first ten days post-inoculation, but no granulomatous lesions were detected during the 15-day infection period. However, the same inoculated bacteria were recovered from the spleen of dead animals or survivors at the end of the experiment and identified by PCR amplification and sequencing. These findings indicate that tilapia in Mexican aquaculture is susceptible to diseases described in other countries, and the freshwater aquaculture industry is at risk.</p>
Suggested Reviewers:	<p>Marco Antonio Lopez-Torres University of Sonora marco.lopez@unison.mx Expert in fish and crustacean pathogens</p> <p>Emyr Peña-Marin Autonomous University of Baja California - Ensenada Campus emyr.pea@uabc.edu.mx Expert in fish aquaculture, husbandry and disease</p> <p>Melba Bondad-Reantaso Food and Agriculture Organization of the United Nations melba.reantaso@fao.org Expert in fish disease</p> <p>Ha Thanh Dong Asian Institute of Technology</p>

	htdong@ait.ac.th Expert in fish disease
	José Reyes Gonzalez-Galaviz Sonora Institute of Technology jose.gonzalez@itsn.edu.mx Expert in fish aquaculture and biology
Opposed Reviewers:	

June 27, 2024

Declaration of interest statement

On behalf of all co-authors, I hereby declare that this manuscript has not been published previously in any form, and it is not under consideration for publication elsewhere. This publication is approved by all authors and tacitly by the responsible authorities where the work was carried out. Finally, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English, or any other language, including electronically, without the copyright holder's written consent.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Marcel Martínez-Porchas". The signature is fluid and cursive, with a large, stylized initial 'M'.

Dr. Marcel Martínez-Porchas

Corresponding author

Highlights

HIGHLIGHTS

- Three tilapia farms located in different states of Mexico reported disease signs.
- Biochemical and molecular identification revealed *Edwardsiella anguillarum*, *Nocardia asteroides*, and *Streptococcus agalactiae*.
- Pathogenicity was confirmed in laboratory conditions by intraperitoneally injecting healthy tilapia.

Microbial Pathogenesis

First identification of pathogenic *Edwardsiella anguillarum*, *Nocardia asteroides*, and *Streptococcus agalactiae* in tilapia (*Oreochromis niloticus*) farmed in Mexico

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	YMPAT-D-24-01943
Article Type:	Research Article
Keywords:	<i>Edwardsiella anguillarum</i> ; <i>Nocardia asteroides</i> ; <i>Streptococcus agalactiae</i> ; tilapia; emerging disease
Corresponding Author:	Marcel Martínez-Porchas Centre for Food Research and Development MEXICO
First Author:	Pablo Martínez-Lara
Order of Authors:	Pablo Martínez-Lara Jorge Hernández-López Francisco Vargas-Albores Gloria Yepiz-Plascencia Teresa Gollas-Galván Marcel Martínez-Porchas Rigoberto Montes-Vara Daniel Coronado-Molina
Abstract:	Three different bacteria strains of the <i>Nocardia</i> , <i>Edwardsiella</i> , and <i>Streptococcus</i> genera were isolated from tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) cultivated in Mexican farms with reports of granulomatous disease and mortality. The isolates were obtained from the tilapia spleen and characterized by biochemical tests, real-time PCR, and 16S rRNA sequencing. Comparisons with the GenBank Database indicated a 99.63% and 99.87% sequence identity to the 16S rRNA of the isolated samples with <i>Edwardsiella anguillarum</i> and <i>Nocardia asteroides</i> , respectively, and 100% to <i>Streptococcus agalactiae</i> . The pathogenicity of these bacteria was confirmed in a bioassay challenge by intraperitoneally injecting healthy adults of tilapia. The infected tilapia displayed characteristics of pathological processes such as lethargy, erratic swimming, darkening of skin, and death. High mortalities were observed the first ten days post-inoculation, but no granulomatous lesions were detected during the 15-day infection period. However, the same inoculated bacteria were recovered from the spleen of dead animals or survivors at the end of the experiment and identified by PCR amplification and sequencing. These findings indicate that tilapia in Mexican aquaculture is susceptible to diseases described in other countries, and the freshwater aquaculture industry is at risk.
Suggested Reviewers:	<p>Marco Antonio Lopez-Torres University of Sonora marco.lopez@unison.mx Expert in fish and crustacean pathogens</p> <p>Emyr Peña-Marin Autonomous University of Baja California - Ensenada Campus emyr.pea@uabc.edu.mx Expert in fish aquaculture, husbandry and disease</p> <p>Melba Bondad-Reantaso Food and Agriculture Organization of the United Nations melba.reantaso@fao.org Expert in fish disease</p> <p>Ha Thanh Dong Asian Institute of Technology</p>

Declaration of Interest Statement

June 27, 2024

Declaration of interest statement

On behalf of all co-authors, I hereby declare that this manuscript has not been published previously in any form, and it is not under consideration for publication elsewhere. This publication is approved by all authors and tacitly by the responsible authorities where the work was carried out. Finally, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English, or any other language, including electronically, without the copyright holder's written consent.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Marcel Martínez-Porchas". The signature is written in a cursive style with a large, stylized initial 'M'.

Dr. Marcel Martínez-Porchas

Corresponding author

Highlights

HIGHLIGHTS

- Three tilapia farms located in different states of Mexico reported disease signs.
- Biochemical and molecular identification revealed *Edwardsiella anguillarum*, *Nocardia asteroides*, and *Streptococcus agalactiae*.
- Pathogenicity was confirmed in laboratory conditions by intraperitoneally injecting healthy tilapia.

First identification of pathogenic *Edwardsiella anguillarum*, *Nocardia asteroides*, and *Streptococcus agalactiae* in tilapia (*Oreochromis niloticus*) farmed in Mexico

Pablo Martínez-Lara^a, Jorge Hernández-López^b, Francisco Vargas-Albores^a, Gloria Yepiz-Plascencia^b, Teresa Gollas-Galván^a, Marcel Martinez-Porchas^{a*}, Rigoberto Montes-Vara^c, Daniel Coronado-Molina^b

^a Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, CIAD, A.C. Carretera a La Victoria Km. 0.6, Hermosillo, Sonora, 83304, Mexico

^b Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, CIBNOR, A.C. Calle Hermosa 101, Hermosillo, Sonora, 83106, Mexico.

^c Comité Estatal de Sanidad Acuícola del Estado de Morelos, como Asociación Civil Av. Cuauhtemoc #2, Ex Hacienda San Nicolás Galeana, C.P.62785, Zacatepec de Hidalgo, Morelos, México.

*Corresponding author: marcel@ciad.mx

1 ABSTRACT

Three different bacteria strains of the *Nocardia*, *Edwardsiella*, and *Streptococcus* genera were isolated from tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultivated in Mexican farms with reports of granulomatous disease and mortality. The isolates were obtained from the tilapia spleen and characterized by biochemical tests, real-time PCR, and 16S rRNA sequencing. Comparisons with the GenBank Database indicated a 99.63% and 99.87% sequence identity to the 16S rRNA of the isolated samples with *Edwardsiella anguillarum* and *Nocardia asteroides*, respectively, and 100% to *Streptococcus agalactiae*. The pathogenicity of these bacteria was confirmed in a bioassay challenge by intraperitoneally injecting healthy adults of tilapia. The infected tilapia displayed characteristics of pathological processes such as lethargy, erratic swimming, darkening of skin, and death. High mortalities were observed the first ten days post-inoculation, but no granulomatous lesions were detected during the 15-day infection period. However, the same inoculated bacteria were recovered from the spleen of dead animals or survivors at the end of the experiment and identified by PCR amplification and sequencing. These findings indicate that tilapia in Mexican aquaculture is susceptible to diseases described in other countries, and the freshwater aquaculture industry is at risk.

KEYWORDS:

Edwardsiella anguillarum, *Nocardia asteroides*, *Streptococcus agalactiae*, tilapia, *Oreochromis niloticus*, granulomatous infections

2 INTRODUCTION

Aquaculture has achieved a remarkable economic revolution (Dadar, et al., 2016), and the global expansion of finfish aquaculture in both freshwater and marine settings is a continual trend (Buchmann, 2022). This industry now plays a pivotal role in supplying fish products for human consumption and is considered the fastest-emerging activity worldwide in the food industry (Dadar, et al., 2016), rivaling the output of capture fisheries. Tilapia (*Oreochromis* spp.) is probably the most valuable cultivated organism due to the world market's high demand, easy production, and resilience to adverse environmental conditions (Lee and Wendy, 2017). It is the most extensively farmed species after carp (Thompson, et al., 2023). However, one critical challenge in fish farming is the economic setback resulting from outbreaks of infectious diseases, leading to elevated mortality rates (Dadar, et al., 2016); the escalating incidence of disease spread has imposed limitations on aquaculture production (Ma, et al., 2023).

Opportunistic pathogens are commonly observed in intensive Mexican fish farming, giving rise to disease outbreaks in tilapia. Examples include confirmed cases of francisellosis caused by *Francisella noatunensis* subsp. *Orientalis* (Ortega, et al., 2016), streptococcosis caused by *Streptococcus iniae* (Ortega, et al., 2018), and nocardiosis caused by *Nocardia seriolae* (Del Rio-Rodriguez, et al., 2021). *Edwardsiella ictaluri* (Soto, et al., 2012) is also an opportunistic bacterium but has not been detected in Mexico. Nocardiosis and edwardsiellosis are systemic diseases impacting various animals, including humans and fish (Kandi, 2015; Lee, et al., 2010; Shetty, et al., 2014). Lesions resulting from these diseases are localized in the skin and various internal organs, including the kidney, liver, and spleen, and are characterized by the typical nodular structure of granuloma formation. Detectable symptoms typically do not manifest during the early stages in fish, but tissue invasion occurs gradually. Consequently, nocardiosis and edwardsiellosis often go undetected in aquaculture until

mid-anaphase of breeding, leading to economic losses for breeders (Elkesh, et al., 2013; Wang, et al., 2017; Xu and Zhang, 2014). As opportunistic pathogens, infections caused by both bacteria tend to appear in immunocompromised, stressed, or injured fish (Wang, et al., 2017; Xu and Zhang, 2014).

Identifying potential etiological agents before infiltrating crucial aquaculture sectors is vital to prevent potential epidemics, which could escalate into pandemics across different countries, as observed in the case of shrimp farming. This study reports the isolation, identification, and characterization of two different bacteria causing disease outbreaks in tilapia farms in Mexico.

3 MATERIALS AND METHODS

3.1 Samples

A sanitary diagnostic analysis was conducted on tilapia (*Oreochromis niloticus*); samples consisted of spleen tissue with granulomatous lesions, which were aseptically collected from three distinct farms situated in the Mexican states of Morelos (MOR) in 2015, Sinaloa (SIN) in 2017, and Chiapas (CHI) in 2022. MOR samples were obtained from granulomatous lesions in tilapia weighing 150-180 g and provided by the Morelos Committee of Aquaculture Health and Safety (CESAEM, Comité Estatal de Sanidad Acuícola del Estado de Morelos). SIN samples were spleens from clinically diseased tilapias (170-180 g), showing granulomatous formations obtained from a commercial farm. Similarly, CHI samples comprised granulomatous lesions from tilapia (150–160 g) spleens. All samples were transported refrigerated in sealed 15 ml conical tubes at the Reference, Analysis, and Diagnosis in Aquaculture Health Laboratory (LARADSA) of the Northwest Biological Research Center (CIBNOR) for their analyses.

2.2 Bacteriological analyses and phenotypic characterization

Approximately one cm³ of tissue was aseptically dissected from the most evident nodules placed in a test tube containing 0.8% saline solution and macerated using a plastic pestle. A small amount of the supernatant was spread on Columbia blood agar (CBA, Sigma Aldrich) and MacConkey Agar plates (BD Difco). All samples were aerobically incubated for 48 hours at 28°C for ten days. Colonies were examined using Gram and Kinyoun stain. For each case, representative colonies were selected and streaked onto sterile CBA and trypticase soy agar (TSA) plates, then incubated at 28°C for 72 hours for SIN and CHI samples; MOR isolates were incubated at 28°C for ten days. Individual representative colonies were again examined using Gram and Kinyoun stains, and biochemical and morphological tests were done to confirm the purity of cultures for all samples. For the biochemical profile, purified colonies were cultured in trypticase soy broth (TSB, BD Difco). Biochemical tests were conducted for glucose, lactose, and saccharose fermentation, hydrogen sulfide and indole production, citrate, motility, ornithine decarboxylase, oxidase, and catalase tests.

3.2 16S rRNA Sequencing and Molecular Identification

Genomic DNA was extracted from one colony for each isolate from pure cultures. Briefly, the samples were mechanically lysed using a Fastprep 5G with Lysing Matrix A (MP Biomedicals, USA), and the DNA extraction was carried out using the FASTDNA™ Spin Kit (MP Biomedicals, USA) following manufacturer instructions. Two µL was used for real-time PCR amplification from each extracted DNA sample. A long fragment of 1300 bp corresponding to the 16S rRNA gene was amplified from the genomic DNA samples using the universal primers 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTC-3') (Lane, 1991) and 1387R (5'-GGGCGGWTGTACAAGGC-3') (Marchesi, et al., 1998). The PCR program was one step of 1 min at 94 °C; 30 cycles of 1 min at 94

°C, 1 min at 55 °C and 2 min at 72 °C; and an elongation period of 10 min at 72 °C. The PCR product was analyzed in a 2.0% agarose gel and stained with SybGoldII (Invitrogen). The corresponding band was cut from the gel and purified using the GFX™ PCR and Gel Band Purification kit (Illustra), following the manufacturer's instructions. Purified amplicons were quantified in a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific). DNA strands were sequenced at the Synthesis and Sequencing Unit (UNAM Institute of Biotechnology). Raw data were cleared and globally aligned using CAP3 to obtain the contig, removing the extreme ambiguities and considering only both directions sequenced segments. The sequence obtained was compared to the rRNA/ITS highly similar sequences database of GenBank and also using SINA (SILVA Incremental Aligner) Search and Classify Enabling, which forced to additionally classify the sequences with the least common ancestor (LCA) method based on taxonomies hosted by SILVA (Pruesse, et al., 2012).

Furthermore, after comparing the taxonomically related bacteria for each sample using BLASTN obtained from GenBank, an alignment was conducted with MUSCLE (Edgar, 2004). Phylogenetic trees were then constructed using the Maximum Composite Likelihood method (Kleinbaum and Klein, 2010), and phylogenetic reconstructions were performed using MEGA 11 software. All samples were inferred using the Neighbor-Joining method, and a bootstrap consensus tree from 1000 replicates was generated to represent the evolutionary history of the analyzed taxa.

3.3 Experimental Infections

The isolates recovered from granulomatous lesions of aquaculture tilapia (MOR, SIN, and CHI) were used to make experimental infections in tilapia and confirm their pathogenicity. One hundred and eighty apparently healthy fish (20 – 25 cm and 70 – 80 g) were obtained from a farm without disease reports and transported at 1 g/m³ density (DO ≥5 mg/l) to LARADSA in Hermosillo, Sonora. Fish

were kept in quarantine in 500 L plastic tanks (4.5 mg/l oxygen at 28 °C) for 48 h. The specimens were randomly divided into four groups consisting of three treatments and one control with 15 individuals each and three replicates. All the groups were acclimatized for 48 h in six 60-liter tanks with chlorine-free water, constant aeration (4.5 mg/L at 28 °C), and a ten-hour daylight cycle. Challenges were performed by inoculating intraperitoneally 100 µL of MOR, SIN, and CHI pure isolates (7.5×10^6 UFC/mL). The control group was injected with 100 µl of 0.9% sterile commercial saline solution. All groups were fed *ad libitum* (Nutripec 1.5mm pellets with 44% protein and 15% fat), and 50% water exchange and fecal matter were removed daily. Behavior alterations, clinical signs, and mortality data were registered during the trial, which lasted 15 days. Dead fish were removed, and spleen and liver samples were used to recover and identify infecting bacteria by amplification by real-time PCR of the 16S rRNA gene, as previously mentioned. This identification process was also used at the end of the trial with the surviving fish, which were euthanized by anesthesia overdose (250 mg/L MS-222), following the protocol authorized by the institutional CIAD Ethics Committee (Registration: CONBIOÉTICA-26-CEI-001-20200122).

3.4 Identification by PCR

For molecular identification, liver and spleen samples were aseptically removed and placed in a TSB medium. After 24 h incubation, bacteria were collected by centrifugation, and DNA was extracted using a Fastprep 5G with Lysing Matrix A (MP Biomedicals, USA) and FASTDNA™ Spin Kit (MP Biomedicals, USA). Two µL were used for real-time PCR amplification using a LightCycler 480II thermal cycler (Roche). *Edwardsiella* and *Streptococcus* were identified by amplifying the divergent region of the *gyrB* gene (Lan, et al., 2008) and the *groEL* (Leigh, et al., 2018), respectively. For *Nocardia* identification, two pairs of specific primers amplifying the 16S rRNA were required

(Engelsma, et al., 2008) (Carella, et al., 2013). Primer sequences and corresponding references are shown in Table 2.

4 RESULTS

4.1 Isolation and Identification from Commercial Tilapia Farms

The isolates were identified using biochemical tests, Gram staining, and real-time PCR. Four distinct morphotypes were confirmed after isolation. Two Gram-negative, catalase-positive short rods, with growth in ABS and TSA medium cultures, showing distinctive punctate and flat colonies, respectively, were observed in SIN samples. Both isolates from SIN grew in McConkey Agar at 30 °C without fermenting lactose but utilizing glucose in the IMViC tests and without producing hemolysis in the CBA. The results from the biochemical tests suggested that they are *Aeromonas* spp and *Edwardsiella* spp. The MOR isolate was a Gram-positive bacillus with branched groupings resembling characteristics of actinomycetes, and the Kinyoun test showed a weak acid-alcohol resistance reaction (Maekawa, et al., 2018). The MOR isolate was also catalase-positive and lactose-negative but exhibited glucose fermentation in the IMViC tests while smelling to moist or wet soil, characteristic of the *Nocardia* genus (Corti and Fioti, 2003). Gram-positive β -hemolytic coccus lactose-negative and catalase-negative were found in the CHI isolate, suggesting the presence of *Streptococcus* genus. Biochemical test results are summarized in Table 1, and molecular analyses confirmed the corresponding identity.

4.2 Sequencing Analysis and Molecular Identification

After sequencing the 16S RNA genes, each pair of the corresponding sequences (forward and reverse) was globally aligned, and end ambiguities were removed. The assembled sequences were deposited at GenBank as SGLFS1 (SIN isolated; Accession number PP493833), SGLFM1 (MOR isolate; Accession number PP493834) and SGLFCH1 (CHI isolate; Accession number PP493834). The BLASTN at NCBI and SINA at SILVA allowed the taxonomical identification. Using BLASTN at GenBank database, the 16S rRNA gene sequence for the SIN isolated (SGLFS1) showed the highest identity (99.63%) to *Edwardsiella anguillarum* strain ET080813 (Accession number NR_136429), while by SINA, using the SILVA database, the best identity was to *Edwardsiella* (99.75%). The phylogenetic analysis showed that SGLFS1 was grouped in the same clade as *E. anguillarum* strain ET080813 and very close to other *Edwardsiella* species (Figure 2). The MOR isolate (SGLFM1) registered a 99.87% identity to *Nocardia asteroides* strain NBRC 15531 (Accession number NR_041856) by BLASTN while using SINA, it was identified at genus level as *Nocardia* (99.45%). The phylogenetic analysis showed a close relationship between SGLFM1 (MOR isolate) and other *Nocardia asteroides* strains (Figure 3). Similarly, by BLASTN, the CHI isolate (SGLFCH1) was identified up to species level with 100% identity to *Streptococcus agalactiae* strain ATCC 13813 (Accession number NR_115728), while for SINA, the 100% identity was to the genus *Streptococcus*. The phylogenetic tree and its highest similar sequences grouped SGLFCH1 (CHI isolate) in the same clade as *Streptococcus agalactiae* strain ATCC 13813 (Figure 4).

4.3 Experimental Infections

The isolates from MOR, SIN, and CHI, identified as *Edwardsiella anguillarum*, *Nocardia asteroides*, and *Streptococcus agalactiae*, respectively, are pathogenic for tilapia. Therefore, they were used to infect healthy organisms, observe the disease's evolution, and recover the causal agent. The survival

of fish inoculated with *N. asteroides* decreased linearly until reaching zero on the ninth day of postinfection. Similarly, although with a lower slope, the mortality of fish inoculated with *E. anguillarum* or *Str. agalactiae* reduced their survival until the eighth or tenth day postinfection, reaching 53% and 40%, respectively. From then on, survival remained unchanged. No mortalities were recorded in the control group (Figure 1). Regardless of the bacteria inoculated, diseased fish showed less activity (lethargy), color loss during early infection (3 days postinfection), and body darkening during late infection (10 days postinfection).

4.4 Identification of inoculated bacteria

Following inoculation, the detection of the inoculated pathogens was carried out using PCR with specific primers. The pathogens were explicitly searched for in fish that died during infection. *Edwardsiella* was identified and confirmed by amplifying the divergent region of the partial *gyrB* gene, producing an amplicon of 416 bp. *Streptococcus agalactiae* was determined using *groEL* primers. For the *Nocardia* genus, two pairs of specific primers were used to amplify the 16S rRNA gene, yielding expected products of 765 and 360 bp, respectively. The MOR, SIN, and CHI isolates were successfully recovered and confirmed in their respective groups, confirming mortality caused by the infection. In the control group, no bacterial growth was observed, and direct extraction of DNA from target organs did not result in amplification.

5 DISCUSSION

5.1 Samples, bacteriological analyses, phenotypic characterization and 16S rRNA Sequencing

Although there is increasing interest in studying the defense mechanisms in fish, there is still limited information on the response mechanisms to certain infections (Byadgi, et al., 2016; Rajme-Manzur, et al., 2021). Granulomatous diseases significantly threaten aquaculture production systems due to their chronic nature, often leading to late-stage detection and recurrence. Fish granulomatous infection exhibits similar characteristics in mammals, but not all of the information can be extrapolated due to quantitative and qualitative differences in the immune system. Thus, the interactions between bacteria and the mechanisms underlying the formation of granulomatous lesions in the fish's immune system are not fully understood. However, there is a consensus regarding the compromise of the immune system response (stress due to poor feeding, water quality, nutrition, high population densities, etc.) and the creation of a niche that favors pathogen survival (Martínez - Lara, et al., 2020; Swaim, et al., 2006).

Among the numerous pathogenic bacteria related to fish infections, members of *Edwardsiella* and *Nocardia* genera are crucial mainly because they cause granulomatous infections (Martínez - Lara, et al., 2020; Rajme-Manzur, et al., 2021). *E. tarda* had been the most common bacteria associated with edwardsiellosis (Mohanty and Sahoo, 2007), but *E. piscicida* and *E. anguillarum* have gained greater relevance in recent years (Armwood, et al., 2022; Hu, et al., 2022; Leung, et al., 2019), although neither *E. piscicida* nor *E. anguillarum* has been related to granulomatous processes in Mexican aquaculture until now. A Gram-negative short rod was isolated from SIN samples, and its 16S rRNA gene sequence presented a high identity (98.63%) to *E. anguillarum*, and its belonging to

the genus was confirmed by the amplification of its 416-bp fragment of the *gyrB* gene divergent region through real-time PCR. Also, the phylogenetic analysis showed that the SIN isolate was grouped in the same clade as *Edwardsiella anguillarum* and very close to other *Edwardsiella* species (figure 2). A recent study by da Costa, et al. (2022) analyzed 62 genomes of *Edwardsiella* sp. from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database through taxonomic and pan-genomic analyses. It detected that some genomes have been incorrectly classified. Consequently, this led to incorrect identification of different *Edwardsiella* spp detected in freshwater and marine aquaculture fish. To the best of our knowledge, we are reporting the first case of granulomatous infection by *E. anguillarum* in aquacultured Mexican tilapia. This strain was highly aggressive, producing 100% mortality after nine days of experimental infection.

Four *Nocardia* species, *N. asteroides*, *N. seriolae*, *N. salmonicida*, and *N. crassostreae*, have been isolated from fish undergoing nocardiosis (Itano, et al., 2006). The *Mycobacterium* and *Nocardia* genera have clinical and bacteriological similarities. However, while *Mycobacterium* presents acid-alcohol resistance, *Nocardia* exhibits weak acid-alcohol resistance (Muricy, et al., 2014). Del Rio-Rodriguez, et al. (2021) described the first nocardiosis in Mexico by *Nocardia seriolae* in farmed red drum (*Sciaenops ocellatus*, Linnaeus). From the MOR samples, a rod weak acid-alcohol resistant and had similar morphological characteristics to the described by Itano, et al. (2006) and Del Rio-Rodriguez, et al. (2021), and its 16S rRNA gene was amplified, producing 765 and 360 pb amplicons, as corresponding to *Nocardia* sp. In addition, the 16S rRNA gene complete sequence is similar and is phylogenetic close to *Nocardia asteroides* (figure 3). This identity was confirmed by the SINA classifier using the SILVA database. To the extent of our knowledge, this is the first study to report this species as the cause of nocardiosis in tilapia in Mexican aquaculture. It serves as a notification

about the spread of the pathogen and to alert producers and health authorities about the presence of at least two species of *Nocardia*, affecting different cultivated species.

The CHI isolate was Gram-positive cocci, with a 100% identity with at least three other strains of *S. agalactiae*, and was located in the same clade in the phylogenetic analysis (figure 4). This was confirmed by amplifying by real-time PCR the *groEL* gene specific for this species, as described by (Leigh, et al., 2018). Only *Streptococcus iniae* and *S. agalactiae* have been associated with granulomatous processes in aquaculture in tilapia (Ortega, et al., 2018; Piamsomboon, et al., 2022). Nonetheless, only *S. iniae* has been documented in tilapia in Mexico. This marks the initial report of the species *S. agalactiae* in Mexican tilapia aquaculture from granulomatous lesions.

5.2 Experimental Infections

Based on the abovementioned information, we conducted experimental challenges using bacterial isolates obtained from granulomatous lesions in tilapia commercial aquaculture. Despite using lower concentrations than those reported in the literature (Iregui, et al., 2016), granulomatous lesions were not observed during our 15-day trial and under the established conditions. Because the formation of granulomatous lesions relies on a balance between the immune system and the infection process, as well as their evasion mechanisms (Rajme-Manzur, et al., 2021) and not all bacteria can induce these types of lesions, searching for specific stress conditions to simulate the intensification of aquaculture systems could be fundamental to induce granuloma formation with known granulomatous-formation bacteria. However, our results highlight three different outbreaks of different pathogens that occurred independently in three different farms, and the three bacterial isolates caused severe mortality to tilapia in the laboratory challenges. The data indicate that Mexican tilapia aquaculture may be exposed to new diseases.

6 ACKNOWLEDGMENTS

Special thanks to CONACHYT for the financial support to project A1-S-36629. Also, thanks to Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora for providing the tilapia (*Oreochromis niloticus*)

7 DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data will be available on request.

8 REFERENCES

- Armwood, A.R., Griffin, M.J., Richardson, B.M., Wise, D.J., Ware, C., Camus, A.C., 2022. Pathology and virulence of *Edwardsiella tarda*, *Edwardsiella piscicida*, and *Edwardsiella anguillarum* in channel (*Ictalurus punctatus*), blue (*Ictalurus furcatus*), and channel x blue hybrid catfish. *J. Fish Dis.* 45, 1683-1698. <https://doi.org/10.1111/jfd.13691>
- Buchmann, K., 2022. Control of parasitic diseases in aquaculture. *Parasitology.* 149, 1985-1997. <https://doi.org/10.1017/S0031182022001093>
- Byadgi, O., Chen, C.W., Wang, P.C., Tsai, M.A., Chen, S.C., 2016. *De novo* transcriptome analysis of differential functional gene expression in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) after challenge with *Nocardia seriolae*. *Int. J. Mol. Sci.* 17. <https://doi.org/10.3390/ijms17081315>
- Carella, F., Carrasco, N., Andree, K.B., Lacuesta, B., Furones, D., De Vico, G., 2013. Nocardiosis in Mediterranean bivalves: first detection of *Nocardia crassostreae* in a new host *Mytilus galloprovincialis* and in *Ostrea edulis* from the Gulf of Naples (Italy). *J. Invertebr. Pathol.* 114, 324-328. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.10.001>
- Corti, M.E., Fiotti, M.E.V., 2003. Nocardiosis: a review. *Int. J. Infect. Dis.* 7, 243-250.
- da Costa, A.R., Chideroli, R.T., Lanes, G.C., Ferrari, N.A., Chicoski, L.M., Batista, C.E., Pandolfi, V.C.F., Ware, C., Griffin, M.J., Dos Santos, A.R., 2022. Multiplex PCR assay for correct identification of the fish pathogenic species of *Edwardsiella* genus reveals the presence of *E.*

- anguillarum* in South America in strains previously characterized as *E. tarda*. J. Appl. Microbiol. 132, 4225-4235.
- Dadar, M., Dhama, K., Vakharia, V.N., Hoseinifar, S.H., Karthik, K., Tiwari, R., Khandia, R., Munjal, A., Salgado-Miranda, C., Joshi, S.K., 2016. Advances in aquaculture vaccines against fish pathogens: Global status and current trends. Rev. Fish Sci. Aquac. 25, 184-217. <https://doi.org/10.1080/23308249.2016.1261277>
- Del Rio-Rodriguez, R.E., Ramirez-Paredes, J.G., Soto-Rodriguez, S.A., Shapira, Y., Huchin-Cortes, M.D.J., Ruiz-Hernandez, J., Gomez-Solano, M.I., Haydon, D.J., 2021. First evidence of fish nocardiosis in Mexico caused by *Nocardia seriolae* in farmed red drum (*Sciaenops ocellatus*, Linnaeus). J. Fish Dis. 44, 1117-1130. <https://doi.org/10.1111/jfd.13373>
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res. 32, 1792-1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Elkesh, A., Kantham, K., Shimm, A., Crumlish, M., Richards, R., 2013. Systemic nocardiosis in a Mediterranean population of cultured meagre, *Argyrosomus regius* Asso (Perciformes: Sciaenidae). J. Fish Dis. 36, 141-149.
- Engelsma, M.Y., Roozenburg, I., Joly, J.P., 2008. First isolation of *Nocardia crassostreae* from Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Europe. Dis. Aquat. Organ. 80, 229-234. <https://doi.org/10.3354/dao01938>
- Hu, J., Wang, B., Feng, J., Liu, C., Jiang, B., Li, W., Lin, L., Su, Y., 2022. *Edwardsiella piscicida*, a pathogenic bacterium newly detected in spotted sea bass *Lateolabrax maculatus* in China. Aquacult. Rep. 22, 100973.
- Iregui, C.A., Comas, J., Vasquez, G.M., Verjan, N., 2016. Experimental early pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* infection in red tilapia *Oreochromis* spp. J. Fish Dis. 39, 205-215. <https://doi.org/10.1111/jfd.12347>
- Itano, T., Kawakami, H., Kono, T., Sakai, M., 2006. Experimental induction of nocardiosis in yellowtail, *Seriola quinqueradiata* Temminck & Schlegel by artificial challenge. J. Fish Dis. 29, 529-534.
- Kandi, V., 2015. Human *Nocardia* infections: a review of pulmonary nocardiosis. Cureus. 7.
- Kleinbaum, D.G., Klein, M., 2010. Maximum Likelihood Techniques: An Overview. in: Kleinbaum, D.G., Klein, M. (Eds.), Logistic Regression: A Self-Learning Text. Springer New York, New York, NY, pp. 103-127.
- Lan, J., Zhang, X.H., Wang, Y., Chen, J., Han, Y., 2008. Isolation of an unusual strain of *Edwardsiella tarda* from turbot and establish a PCR detection technique with the gyrB gene. J. Appl. Microbiol. 105, 644-651. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03779.x>
- Lane, D., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. Nucl. Acid Tech. Bact. System.
- Lee, S., Najiah, M., Wendy, W., Nadirah, M., 2010. Antibigram and heavy metal resistance of pathogenic bacteria isolated from moribund cage cultured silver catfish (*Pangasius sutchi*) and red hybrid tilapia (*Tilapia* sp.). Front. Agric China. 4, 116-120.
- Lee, S.W., Wendy, W., 2017. Antibiotic and heavy metal resistance of *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda* isolated from red hybrid tilapia (*Oreochromis* spp.) coinfecting with motile aeromonas septicemia and edwardsiellosis. Vet. World. 10, 803-807. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.803-807>
- Leigh, W.J., Zadoks, R.N., Jaglarz, A., Costa, J.Z., Foster, G., Thompson, K.D., 2018. Evaluation of PCR primers targeting the groEL gene for the specific detection of *Streptococcus agalactiae* in the context of aquaculture. J. Appl. Microbiol. 125, 666-674. <https://doi.org/10.1111/jam.13925>

- Leung, K.Y., Wang, Q., Yang, Z., Siame, B.A., 2019. *Edwardsiella piscicida*: A versatile emerging pathogen of fish. *Virulence*. 10, 555-567. <https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1621648>
- Ma, R., Yang, Y., Cao, H., Li, P., 2023. Editorial: Aquaculture animal diseases: pathogens and control. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 13, 1223046. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1223046>
- Maekawa, S., Yoshida, T., Wang, P.C., Chen, S.C., 2018. Current knowledge of nocardiosis in teleost fish. *J. Fish Dis.* 41, 413-419. <https://doi.org/10.1111/jfd.12782>
- Marchesi, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J., Dymock, D., Wade, W.G., 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 795-799. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.2.795-799.1998>
- Martínez - Lara, P., Martínez - Porchas, M., Gollas - Galván, T., Hernández - López, J., Robles - Porchas, G.R., 2020. Granulomatosis in fish aquaculture: a mini review. *Rev Aquacult.* 13, 259-268. <https://doi.org/10.1111/raq.12472>
- Mohanty, B.R., Sahoo, P.K., 2007. Edwardsiellosis in fish: a brief review. *J. Biosci.* 32, 1331-1344. <https://doi.org/10.1007/s12038-007-0143-8>
- Muricy, E.C., Lemes, R.A., Bombarda, S., Ferrazoli, L., Chimara, E., 2014. Differentiation between *Nocardia* spp. and *Mycobacterium* spp.: Critical aspects for bacteriological diagnosis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 56, 397-401. <https://doi.org/10.1590/s0036-46652014000500005>
- Ortega, C., Garcia, I., Irgang, R., Fajardo, R., Tapia-Cammas, D., Acosta, J., Avendano-Herrera, R., 2018. First identification and characterization of *Streptococcus iniae* obtained from tilapia (*Oreochromis aureus*) farmed in Mexico. *J. Fish Dis.* 41, 773-782. <https://doi.org/10.1111/jfd.12775>
- Ortega, C., Mancera, G., Enriquez, R., Vargas, A., Martinez, S., Fajardo, R., Avendano-Herrera, R., Navarrete, M.J., Romero, A., 2016. First identification of *Francisella noatumensis* subsp. *orientalis* causing mortality in Mexican tilapia *Oreochromis* spp. *Dis. Aquat. Organ.* 120, 205-215. <https://doi.org/10.3354/dao02999>
- Piamsomboon, P., Srisuwatanasagul, S., Kongsonthana, K., Wongtavatchai, J., 2022. *Streptococcus agalactiae* infection caused spinal deformity in juvenile red tilapia (*Oreochromis* sp.). *J. Fish Dis.* 45, 603-606. <https://doi.org/10.1111/jfd.13568>
- Pruesse, E., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2012. SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics.* 28, 1823-1829.
- Rajme-Manzur, D., Gollas-Galvan, T., Vargas-Albores, F., Martinez-Porchas, M., Hernandez-Onate, M.A., Hernandez-Lopez, J., 2021. Granulomatous bacterial diseases in fish: An overview of the host's immune response. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 261, 111058. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.111058>
- Shetty, M., Maiti, B., Venugopal, M.N., Karunasagar, I., Karunasagar, I., 2014. First isolation and characterization of *Edwardsiella tarda* from diseased striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage). *J. Fish Dis.* 37, 265-271. <https://doi.org/10.1111/jfd.12039>
- Soto, E., Griffin, M., Arauz, M., Riofrio, A., Martinez, A., Cabrejos, M.E., 2012. *Edwardsiella ictaluri* as the causative agent of mortality in cultured Nile tilapia. *J. Aquat. Anim. Health.* 24, 81-90.
- Swaim, L.E., Connolly, L.E., Volkman, H.E., Humbert, O., Born, D.E., Ramakrishnan, L., 2006. *Mycobacterium marinum* infection of adult zebrafish causes caseating granulomatous tuberculosis and is moderated by adaptive immunity. *Infect. Immun.* 74, 6108-6117. <https://doi.org/10.1128/IAI.00887-06>

- Thompson, K.D., Rodkhum, C., Bunnoy, A., Thangsuman, P., Kitiyodom, S., Sukkarun, P., Yostawornkul, J., Yata, T., Pirarat, N., 2023. Addressing nanovaccine strategies for tilapia. *Vaccines*. 11. <https://doi.org/10.3390/vaccines11081356>
- Wang, F., Wang, X.G., Liu, C., Chang, O.Q., Feng, Y.Y., Jiang, L., Li, K.B., 2017. Transparent Tiger barb *Puntius tetrazona*, a fish model for *in vivo* analysis of nocardial infection. *Vet. Microbiol.* 211, 67-73. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.10.003>
- Xu, T., Zhang, X.-H., 2014. *Edwardsiella tarda*: an intriguing problem in aquaculture. *Aquac.* 431, 129-135.

9 TABLES

9.1 Table 1

Phenotypic and biochemical results were obtained from granulomatous lesions of tilapia from different farms in Mexico.

	Sinaloa (SIN)	Morelos (MOR)	Chiapas (CHI)
Morphology	Bacilli	Filamentous, beading, and branching bacilli	Cocci
Gram	-	+	+
Kinyoun test	ND	Weak positive	ND
Motility	-	-	-
Catalase	+	+	-
Oxidase	-	+	-
Methyl red	+	ND	+
Voges-Proskauer	-	ND	+
Three Sugar Iron medium	K/A	ND	ND
Gas production	+	ND	ND
Indole	+	ND	-
Hemolysis	γ	γ	β
Citrate	-	ND	-
Glucose	+	-	+
Lactose	-	-	-
Manitol	-	ND	-

ND – Not determined; V – Variable; K: Alkaline reaction; A: Acidic reaction.

9.2 Table 2

Primers used in the recovery and identification of bacteria in tilapia challenges.

<i>Target</i>	<i>Primer Name</i>	<i>Primer sequence</i>	<i>Reference</i>
<i>Nocardia spp</i>	Nosp.F01	5'-AGCGCAAGTGACGGTACCTG-3'	(Engelsma, et al., 2008)
	Nosp.R01	5'-CCCTCTGTACCGGCCATTGT-3'	
	NVP1	5'-GCGCAAGTGACGGTACCTAGTAG-3'	(Carella, et al., 2013)
	NVP3	5'- CGTTAGCTACGGCACGGA-3'	
<i>Edwardsiella tarda</i>	gyrBF1	5'-GCATGGAGACCTTCAGCAAT-3'	(Engelsma, et al., 2008)
	gyrBR1	5'-GCGGAGATTTTGCTCTTCTT-3'	
<i>Streptococcus agalactiae</i>	SagroEI2 forward	5'-GCAAGTTTTAGGACAGTCTGCT-3'	(Leigh, et al., 2018)
	SagroEI reverse	5'-AGTTTCAGTGCCGCTACTTT-3'	

10 FIGURES

10.1 Figure 1

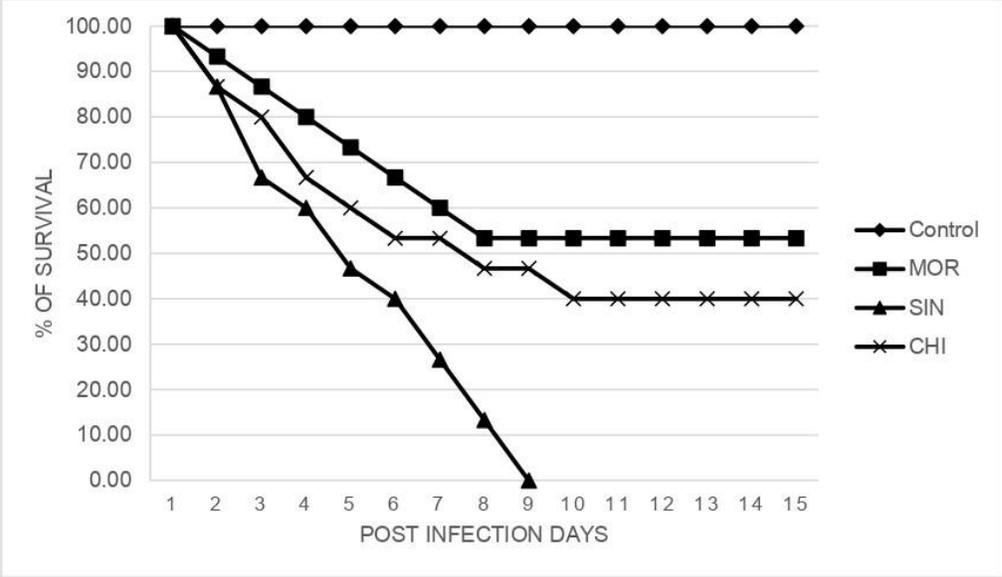


Fig.1. Survival rate of fish challenge in the laboratory with isolates MOR, SIN and CHI obtained from sampled commercial farms. The average values of daily survival obtained from each group from three repetitions of the challenge are shown.

10.2 Figure 2

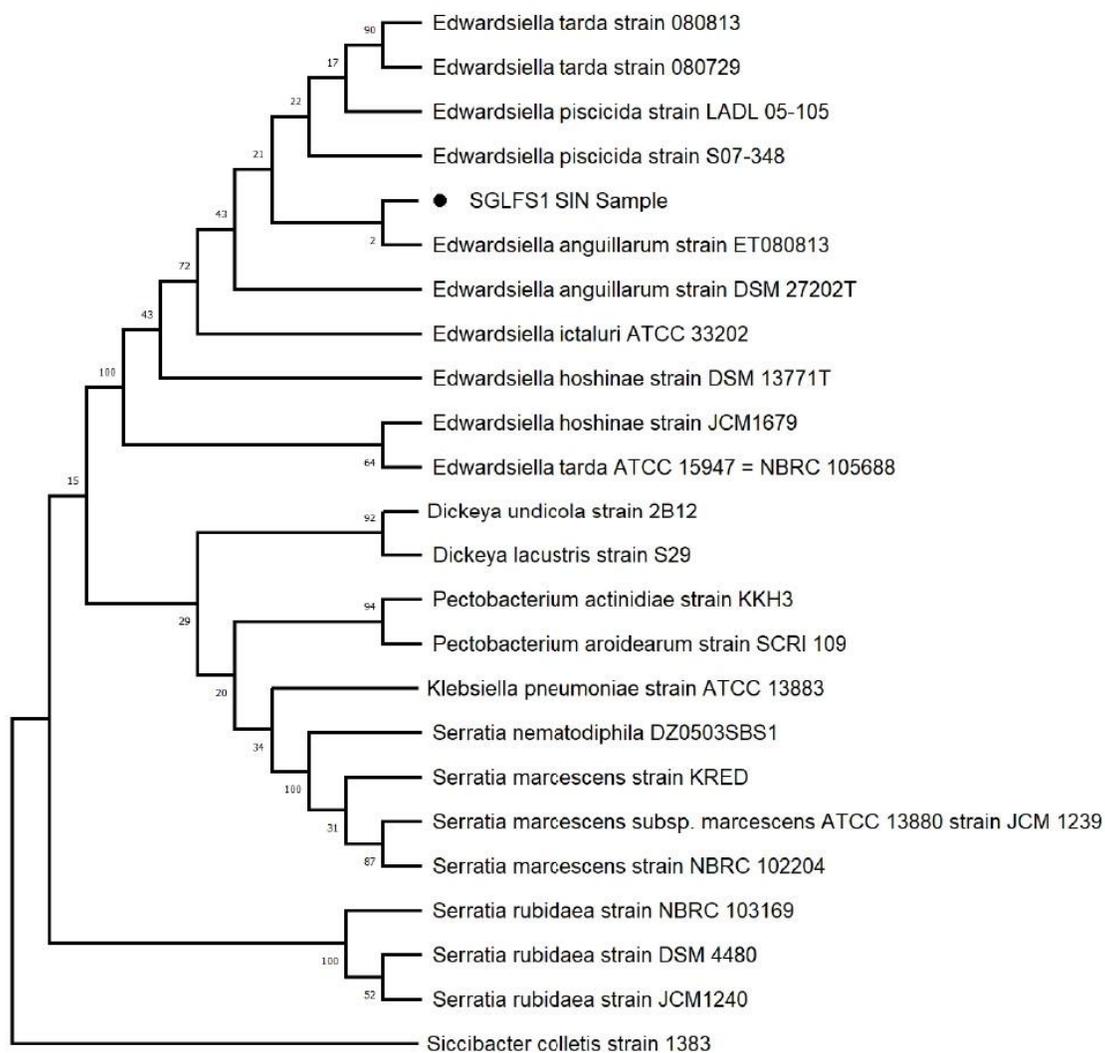


Fig 2. Molecular phylogenetic analysis based on 24 16S rRNA gene. The Mexican SGLFS SIN isolate, *Edwardsiella*, and other bacteria from the Enterobacteriaceae and Pectobacteriaceae families were inferred using the Neighbor-Joining method, and a bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates were taken to represent the evolutionary history of the taxa analyzed. The tree was rooted using *Siccibacter colletis* strain 1383 as an outgroup. The Gram-negative short rod isolate (Black dot) was located in the same group as *Edwardsiella anguillarum* and close to other *E.* species. Note:

The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. The evolutionary distances were computed using the Maximum Composite Likelihood method and are in the units of the number of base substitutions per site. This analysis involved 24 nucleotide sequences. All ambiguous positions were removed for each sequence pair (pairwise deletion option). There were a total of 1546 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA11.

10.3 Figure 3

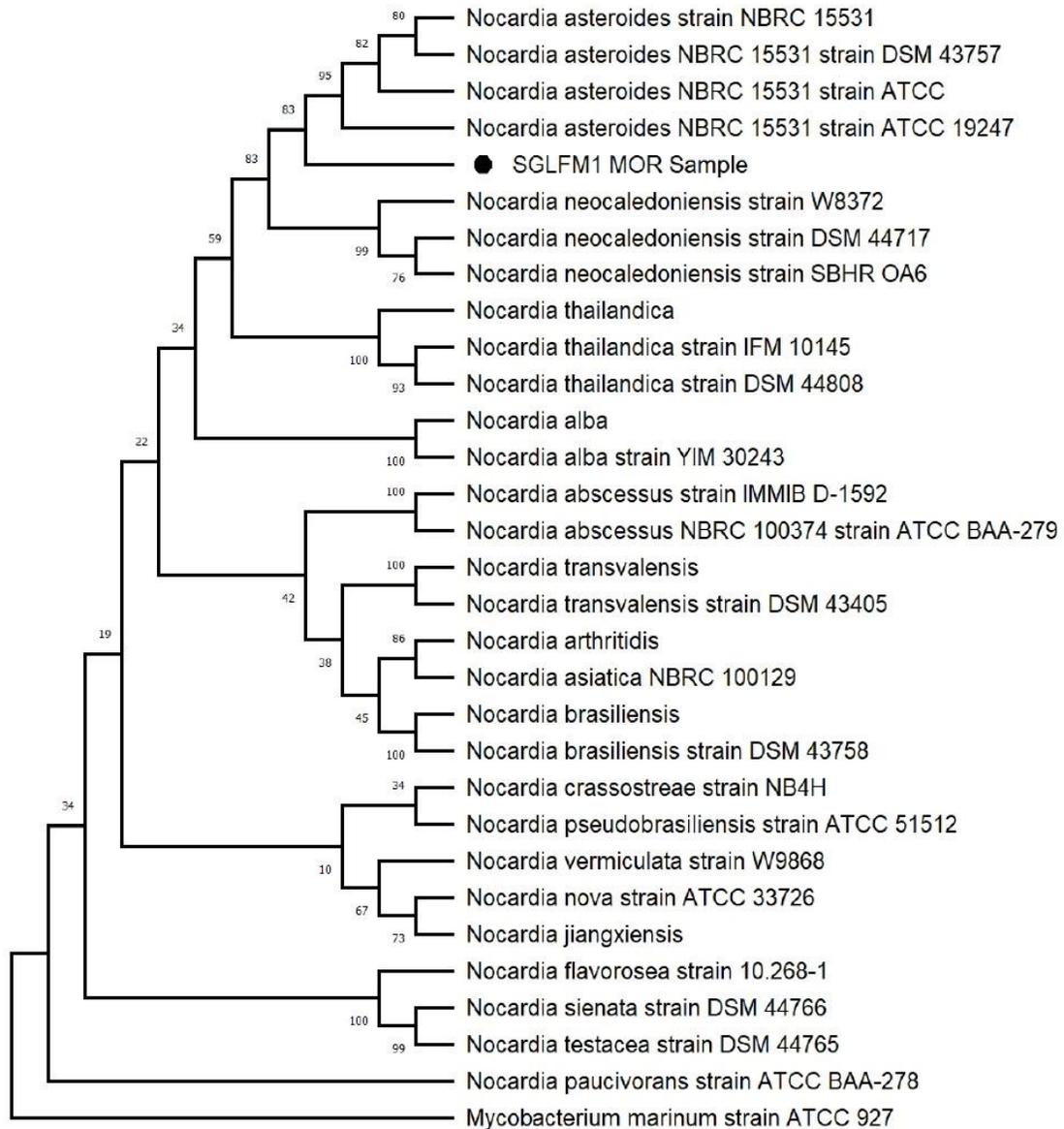


Fig 3. Molecular phylogenetic analysis based on 31 16S rRNA gene. The Mexican SGLFM1 MOR isolate and other *Nocardia* species were inferred using the Neighbor-Joining method, and a bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates was taken to represent the evolutionary history of the

taxa analyzed. The tree was rooted using *Mycobacterium marinum* strain ATCC 927 as an outgroup. The weak acid-alcohol resistance isolate (Black dot) was located in the same group of *Nocardia asteroides*. Note: The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. The evolutionary distances were computed using the Maximum Composite Likelihood method and are in the units of the number of base substitutions per site. This analysis involved 31 nucleotide sequences. All ambiguous positions were removed for each sequence pair (pairwise deletion option). There were a total of 1532 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA11.

10.4 Figure 4

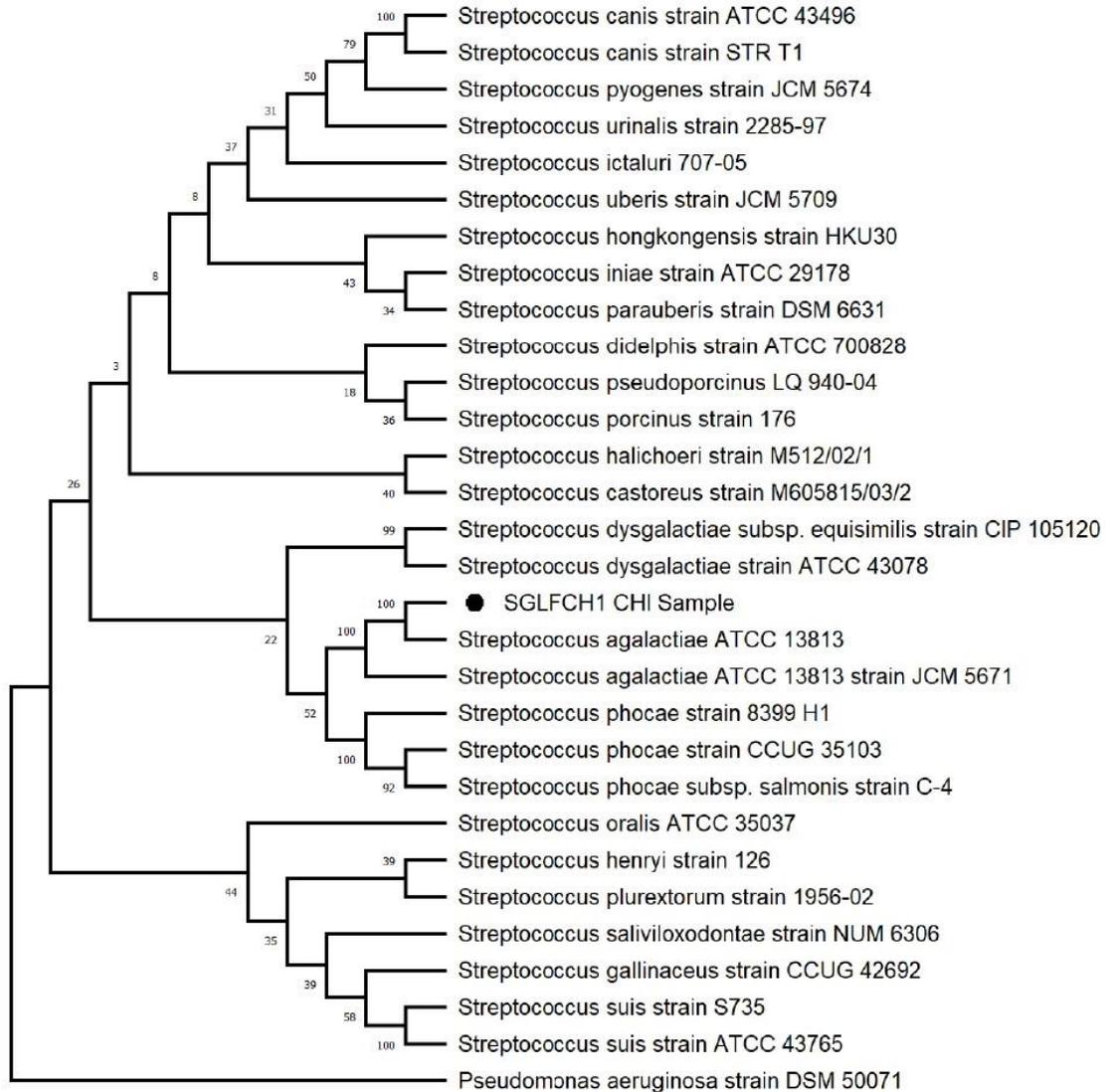


Fig 4. Molecular phylogenetic analysis based on 30 16S rRNA gene. The Mexican CHI isolate and other *Streptococcus* spp. were inferred using the Neighbor-Joining method, and a bootstrap consensus tree from 1000 replicates was taken to represent the evolutionary history of the taxa analyzed. The tree was rooted using *Pseudomonas aeruginosa* strain DSM 50071 as an outgroup. The Gram-positive

cocci (Black dot) was located in the same group of *Streptococcus agalactiae*. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. The evolutionary distances were computed using the Maximum Composite Likelihood method and are in the units of the number of base substitutions per site. This analysis involved 30 nucleotide sequences. All ambiguous positions were removed for each sequence pair (pairwise deletion option). There were a total of 1602 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA11.

4. MICROBIOTA ATTACHED TO AND ENCAPSULATED BY GRANULOMAS DISSECTED FROM TILAPIA SPLEEN: A CASE REPORT

Pablo Martínez Lara¹, Jorge Hernández López², Estefanía Garibay Valdez¹, Diana Medina Félix³,
Marcel Martínez Porchas¹, Daniel Coronado Molina², Romel J Ortiz Luna, José H. Puerto y
Martina Hilda Gracia Valenzuela⁵

1 Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, CIAD, Hermosillo, Mexico

2 Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, CIBNOR, Hermosillo, Mexico

3 Universidad Estatal de Sonora, UES, Hermosillo, Mexico

4 Comité Oaxaqueño de Sanidad e Inocuidad Acuícola, COSIA, Oaxaca, Mexico

5 Instituto Tecnológico del Valle del Yaqui, ITVY, Cajeme, Mexico

Publicado:

28 de noviembre de 2022

En la revista

Aquaculture, Fish and Fisheries

DOI:

<https://doi.org/10.1002/aff2.88>

SHORT COMMUNICATION

Microbiota attached to and encapsulated by granulomas dissected from tilapia spleen: A case report

Pablo Martínez-Lara¹ | Jorge Hernández-López² | Estefanía Garibay-Valdez¹ |
Diana Medina-Félix³ | Marcel Martínez-Porchas¹  | Daniel Coronado-Molina² |
Romel J. Ortiz-Luna⁴ | José H. Puerto⁴ | Martina Hilda Gracia-Valenzuela⁵

¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Biología de Organismos Acuáticos, Hermosillo, Sonora, México

²Centro de Investigaciones Biológicas, Unidad Hermosillo, Hermosillo, Sonora, México

³Universidad Estatal de Sonora, Unidad Hermosillo, Hermosillo, Sonora, México

⁴Comité Oaxaqueño de Sanidad e Inocuidad Acuícola A.C., Oaxaca, México

⁵Instituto Tecnológico del Valle del Yaqui, Sonora, México

Correspondence

Marcel Martínez-Porchas, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Biología de Organismos Acuáticos, Hermosillo, Sonora, México.
Email: marcel@ciad.mx

Funding information

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Grant/Award Number: A1-S-36629

Abstract

Granulomatous diseases are caused mainly by bacterial infections that the fish immune system cannot eliminate; consequently, pathogens are encapsulated, forming a complex structure where immune cells participate in containing the damage. The granuloma is covered by a collagenous layer that may be an attractive surface for external bacteria, leading to the potential development of a microbiota associated with the outer side of granulomas. Therefore, this study aimed to describe the microbiota attached to and encapsulated by granulomas dissected from tilapia spleen obtained from a commercial farm. Tissue samples with an advanced granulomatosis stage were analyzed by amplifying and sequencing the V4 variable region of the 16S rRNA gene. More than 20 phyla were detected attached to granulomas; however, only five represented 94% of the relative abundance, and the genus *Gordonia* was the most abundant with 21.9%. This bacterium has been previously identified in the tilapia gut and has also been reported as the etiologic agent of granulomatous disease in humans and terrestrial animals. This is the first time it has been detected in fish granulomas. Finally, these results provide the first evidence of microbiota attached to granulomatous lesions while demonstrating that these can provide a surface that can harbour highly diverse microbial communities.

KEYWORDS

Gordonia, granulomas, microbiota, tilapia

Granulomatous diseases represent a common problem in fish aquaculture; these can be produced by bacterial infections that may not cause immediate acute effects on the host but cannot be eliminated by the immune system (Martínez-Lara, Martínez-Porchas, Gollas-Galván, Hernández-López, & Robles-Porchas, 2021). Briefly, instead of activating the central mechanisms of immune defence against bacterial

infection, the proliferation of foreign agents is halted by their encapsulation in structures called granulomas. In particular, granulomas were caused by infections characterized by a necrotic core where extracellular bacteria persist surrounded by a cellular homogeneous necrotic debris (Lin et al., 2006). Also, a complex structure of host immune cells is formed, including dendritic cells, macrophages, natural

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2022 The Authors. *Aquaculture, Fish and Fisheries* published by John Wiley & Sons Ltd.

killer-like cytotoxic cells, B lymphocytes, T lymphocytes, and plasma cells surrounded by a collagenous matrix. These can 'wall off' and contain the bacterial nidus to conduct damage containment (Rajme-Manzur et al., 2021). At some point, the organelles of the host's epithelioid and spindle-cells surrounding the granuloma are less numerous, while the cytoskeleton components become prominent (Gauthier et al., 2004), transmuting from being metabolically active cells to structural elements.

Although dozens of pathogenic bacteria have been recorded for teleost fish, a few genera cause granulomatous lesions, including *Nocardia*, *Streptococcus*, *Mycobacterium*, *Lactococcus*, *Francisella*, *Edwardsiella*, *Staphylococcus*, and *Ichthyophonus* (Rajme-Manzur et al., 2021; Rousselet et al., 2018; Shahi, Mallik, Sahoo, Chandra, & Singh, 2018). These are encapsulated into granulomas, and through microscopy, it is observed that only the bacteria that the body cannot eliminate are encapsulated in most cases. However, the degradation of the superficial collagenous layer can cause the leaking of the encapsulated bacteria. This degradation is produced by matrix metalloproteinases upregulated by the internal bacteria (Ruggiero, Pilvankar, & Ford Versypt, 2017); however, the collagenous layer could be an attractive surface for external bacteria, particularly those containing collagenases or capable of triggering a biofouling process. This information could be disruptive and contribute to hypothesizing about possible interactions between granulomatous tissue and external bacteria, which could, at a given moment, affect the integrity of the nodule structure by some mechanism. To the best of our knowledge, there is no evidence of the microbiota associated with fish granulomas. Therefore, this study aimed to describe the microbiota attached to and encapsulated by granulomas dissected from tilapia spleen obtained from a commercial farm.

In the laboratory of the Centro de Investigaciones Biológicas, three tilapia spleen samples were received from a commercial farm of Oaxaca, Mexico (Productores de Mojarra Enríquez) registering fish with granulomatous lesions and 43% mortality. Samples were provided by the Oaxaque Committee of Aquaculture Health and Safety (COSIA). Tilapia specimens were adults weighing ~250 g. The three tissue samples presented an advanced granulomatosis stage, and the granulomas were observed as variable-sized pleiomorphic whitish nodules distributed along the entire organ surface. According to the COSIA report, traditional bacteriology analyses concluded the presumptive diagnosis of *Francisella* spp., and a differential diagnosis discarding *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., and *Mycobacterium* spp. Tests included blood agar growth (+++) and TSA Agar Growth (+++) after incubating at 25°C. Opaque colonies were also observed, variable in size with entire borders, straw-colored, Gram-Negative (cocobacilli), catalase (weakly positive), oxidase(negative), MIO medium: immobile, ornithine decarboxylase negative, indolepositive, and TSI/KLIGLER revealing no gas production nor hydrogen sulfide.

Spleen samples were thoroughly washed with sterile and nuclease-free water (molecular grade), and several nodules sizing 1–2 mm from each sample were dissected using a previously sterilized dissection kit. Afterwards, granulomas were submitted to mechanical lysis using a Fastprep 5G with Lysing Matrix A (MP Biomedicals, USA). The DNA was extracted using the FastDNA™ SPIN Kit (MP Biomedicals, USA).

The V4 variable region of the 16S rRNA gene was amplified using the primers 515F 5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3' and 806R 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3' (Caporaso et al., 2011) with the adaptor sequence, sample-specific eight-base, pad, and linker (Kozich, Westcott, Baxter, Highlander, & Schloss, 2013). The thermocycling conditions were set as follows: 95°C for 3 min, followed by 32 cycles of 95°C/20 s, 55°C/15 s, 72°C/5 min, and a final extension of 72°C for 7 min. Thereafter, the PCR products were purified using the SequalPreplate normalization kit, quantified, and pooled in equimolar concentrations. The concentrations of each sample and the final library were quantified through fluorometry using the Qubit dsDNA HS kit (Invitrogen, USA). A PhiX control library was used, and the sequencing process was performed in a MiSeq platform using the MiSeq Reagent Kit v2 (Illumina, USA). The quantity and quality of raw reads (R1 and R2) were analyzed with the FastQC software control (SRA SUB11145237). A standard QIIME2 pipeline was used to eliminate low-quality reads, merge R1 and R2, denoise reads, and discard chimeras through DADA2 (Bolyen et al., 2019; Callahan et al., 2016). Sequencing depth used to calculate the alpha diversity metrics was set at 10,000 reads per sample. Alpha diversity indices including Shannon, Simpson, and Chao1 were also calculated through QIIME2, where the taxonomic assignment of the readings and the calculation of relative abundance were also carried out. A PICRUSt2 pipeline was used for functional metagenomic prediction (Douglas et al., 2020). The files of amplicon sequence variant (ASVs) abundance table and represented sequences were also used as an input to assess functional predictions and matching ASVs normalized by 16S rRNA copy number against the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database.

An average of 46,885 reads per sample were obtained, and 40,313 resulted after the quality pipeline (<1% reads were unclassified). Results revealed an unexpected diversity in the granuloma samples registering 214–242 OTU (Figure S1) and more than 20 phyla; however, only five phyla, including Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, and Planctomycetes, represented ≥94% of relative abundance (Figure 1). A similar diversity between samples was detected, registering alpha diversity as Chao1, Simpson, and Shannon indices in the range of 214–242, 0.91–0.92, and 5.2–5.3, respectively, a high diversity considering that gut microbiota in tilapia usually register Shannon index values below 5 (Bereded et al., 2021). This suggests that the granulomatous lesion could provide an adequate surface for harbouring a diversity of microbes, indicating that there could also be other interactions with external bacteria. Functional prediction showed a similar profile between samples with a higher abundance of biosynthesis and degradation of proteins, fatty acids, and carbohydrates (Table S1). Although this approach is a case report, the evidence suggests that the external microbiota should be included and studied in granuloma models for more comprehensive approaches (Figure 2).

On average, the most abundant genera detected were *Gordonia* (21.9%), *Ralstonia* (12.7%), *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* (9.3%), *Geobacillus* (2.7%), Bacillaceae (classified at the family level, 2.3%), *Paracoccus* (2.2%), Alphaproteobacteria (Class, 2.0%), and *Mycobacterium* (1.5%) (Figure 3), whereas the rest of genera did not reach 0.5% of representativeness. Some of these are reported with

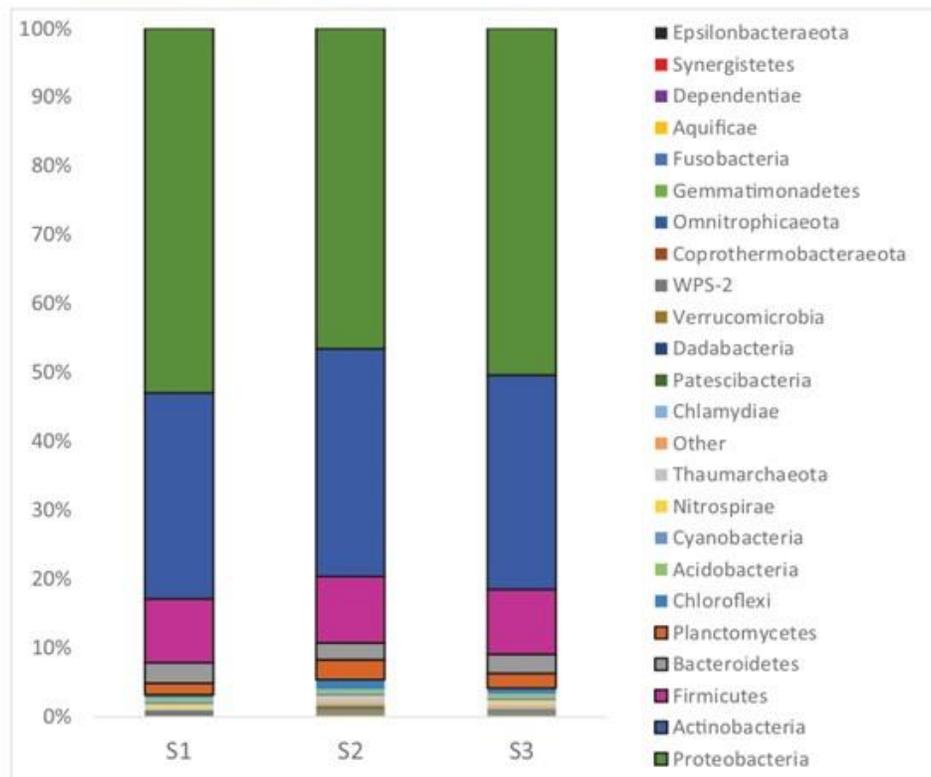


FIGURE 1 Relative abundance of bacterial phyla detected in granulomas dissected from Nile tilapia spleen obtained from a commercial farm. The five most abundant phyla are lined in black.

collagenase activity, including *Geobacillus*, Bacillaceae, *Burkholderia*, and *Acinetobacter* (Itoi, Horinaka, Tsujimoto, Matsui, & Watanabe, 2006; Monboisse, Labadie, & Gouet, 1979; Rainbow, Wilkinson, Sargent, Hart, & Winstanley, 2004), probably taking advantage of the granuloma surface.

The genus *Gordonia*, the most abundant genus and a member of the Nocardiaceae family, has been detected in the tilapia gut and other fish (Giatsis et al., 2015); however, it has been associated with skin lesions and granulomatosis in human and terrestrial animals. Several members of the genus *Gordonia* capable of triggering infectious granulomatous lesions in humans were often incorrectly identified as *Mycobacterium* (Lyamin et al., 2019). In addition, *Nocardia* spp. is a closely related pathogen to *Gordonia*, both causing granulomatous skin infection in humans (Blanc et al., 2007). Interestingly, the evidence suggests that, in this case, *Gordonia* was also mistakenly classified by the health committee as *Francisella* spp. One of the reasons is the absence of molecular tests, which are more accurate. In addition, *Gordonia* is a genus associated with granulomas of terrestrial but not aquatic animals; therefore, the classification may be biased as previously occurred with this same genus. Furthermore, no 16S rRNA (V4) reads were associated with *Francisella* sp., indicating a misclassification; however, further research is required to evaluate if *Gordonia* or other bacterial species behave similar to *Francisella* sp.

To date, no information is available about treatments to eradicate *Gordonia*. Previous studies even demonstrated the immunostimulation of fish by using heat-killed *Gordonia* as an immunostimulant (Shabanzadeh et al., 2016); however, no information about antibiotics for fish has been provided since this genus is not usually associated with disease of these animals.

The pathogenic bacteria in marine fish are often opportunistic specimens thriving as part of the normal seawater microbiota. In this case, this could be the first report associating *Gordonia* with granulomatosis in fish. Besides, the only genus of the rest detected (>1%) that has been associated with granulomatous diseases is *Mycobacterium* (1.5%); however, it is unclear if *Mycobacterium* is the etiologic agent or if it is part of a coinfection or has another role. Nonetheless, it is fully proven that *Mycobacterium* causes granulomatous diseases in fish, so its presence must be associated with the disease.

The only report associating *Gordonia* and *Mycobacterium* to a marine animal disease was provided by Anderson and Petty (2013), detecting this pair of pathogens in seahorse (*Hippocampus erectus*) with symptoms including altered buoyancy and distended upper trunks, enlarged friable kidneys, distended gas bladders containing copious purulent exudate, and necrotic tissue.

Finally, these results provide the first evidence of microbiota associated with granulomatous lesions. The diversity is higher than expected,

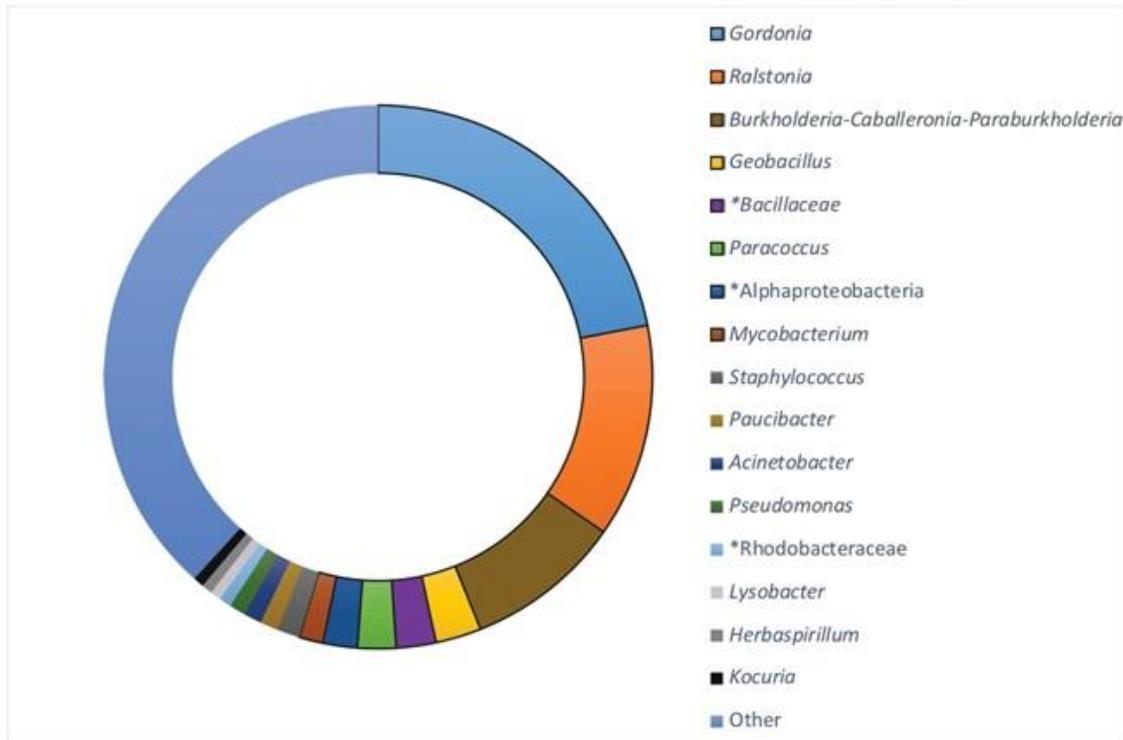


FIGURE 2 Relative abundance of bacterial genera detected in granulomas dissected from Nile tilapia spleen obtained from a commercial farm. The eight most abundant phyla are lined in black. The taxonomic groups nonclassified to the genus level are marked with an asterisk.

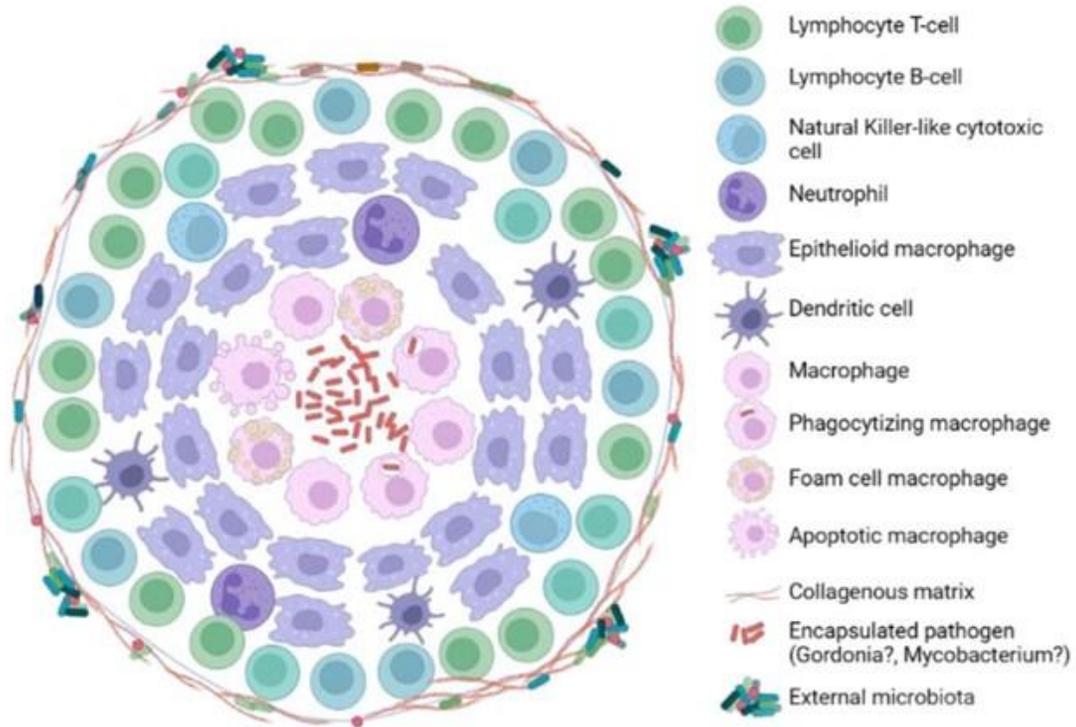


FIGURE 3 Hypothetical basic model of a tilapia granuloma and its encapsulated and external microbiota. Created with BioRender.com

considering these organs may not harbour extensive microbial communities, such as those forming the gastrointestinal tract (Vargas-Albores et al., 2021). In this regard, the granulomatous lesions could favour microbial populations. Besides, it should be considered that this is a case report based on a group of fish and may not represent other farms or fish species.

AUTHOR CONTRIBUTION

Conceptualization, methodology, writing—review and editing, and supervision: Marcel Martínez-Porchas. *Investigation, writing—original draft, and formal analysis:* Pablo Martínez-Lara and Jorge Hernández-López. *Bioinformatics analyses:* Estefanía Garibay-Valdez and Diana Medina-Félix. *Sampling and biochemical analyses:* Daniel Coronado-Molina, Romes Jesús Ortiz-Luna, and José Hermes Puerto. *Writing and images:* Martina Hilda Gracia-Valenzuela.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the financial support to project A1-S-36629. Diana Medina-Felix also thanks CONACYT for the support of the postdoctoral fellowship (CVU 411859, BP-PI-20210508143714282-959117).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy/ethical restrictions.

ETHICS STATEMENT

This investigation was conducted in accordance with fundamental ethical principles and standards, international conventions and declarations on ethical considerations and intellectual property rights.

ORCID

Marcel Martínez-Porchas  <https://orcid.org/0000-0003-4074-6731>

PEER REVIEW

The peer review history for this article is available at: <https://publons.com/publon/10.1002/aff2.88>.

REFERENCES

- Anderson, P.A. & Petty, B.D. (2013) Mixed metazoan and bacterial infection of the gas bladder of the lined seahorse—a case report. *Journal of Aquatic Animal Health*, 25(1), 42–52.
- Bereded, N.K., Abebe, G.B., Fanta, S.W., Curto, M., Waidbacher, H., Meimberg, H. & Domig, K.J. (2021) The Impact of sampling season and catching site (wild and aquaculture) on gut microbiota composition and diversity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Biology*, 10(3), 180.
- Blanc, V., Dalle, M., Markarian, A., Debonne, M., Duplay, E., Rodriguez-Nava, V. & Boiron, P. (2007) *Gordonia terrae*: a difficult-to-diagnose emerging pathogen? *Journal of Clinical Microbiology*, 45(3), 1076–1077.
- Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R., Bokulich, N.A., Abnet, C.C., Al-Ghalith, G.A. & Asnicar, F. (2019) Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852–857.
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A. & Holmes, S.P. (2016) DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J. & Knight, R. (2011) Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(1), 4516–4522.
- Douglas, G.M., Maffei, V.J., Zaneveld, J., Yurgel, S.N., Brown, J.R., Taylor, C.M. & Langille, M.G. (2020) PICRUSt2: an improved and customizable approach for metagenome inference. *BioRxiv*, 2020, 672295.
- Gauthier, D.T., Vogelbein, W.K., & Ottinger, C.A. (2004). Ultrastructure of *Mycobacterium marinum* granuloma in striped bass *Morone saxatilis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 62(1–2), 121–132.
- Giatsis, C., Sipkema, D., Smidt, H., Heilig, H., Benvenuti, G., Verreth, J. & Verdegem, M. (2015) The impact of rearing environment on the development of gut microbiota in tilapia larvae. *Scientific Reports*, 5(1), 1–15.
- Itoi, Y., Horinaka, M., Tsujimoto, Y., Matsui, H. & Watanabe, K. (2006) Characteristic features in the structure and collagen-binding ability of a thermophilic collagenolytic protease from the thermophile *Geobacillus collagenovorans* MO-1. *Journal of Bacteriology*, 188(18), 6572–6579.
- Kozich, J.J., Westcott, S.L., Baxter, N.T., Highlander, S.K. & Schloss, P.D. (2013) Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(17), 5112–5120.
- Lin, P.L., Pawar, S., Myers, A., Pegu, A., Fuhrman, C., Reinhart, T.A. & Flynn, J.L. (2006) Early events in *Mycobacterium tuberculosis* infection in cynomolgus macaques. *Infection and Immunity*, 74(7), 3790–3803.
- Lyamin, A., Zhestkov, A., Nikitina, T., Podsevalov, V., Trofimov, A. & Ismatullin, D. (2019) General characteristics and clinical significance of *Nocardia* and *Gordonia* genera. *Russian Journal of Infection and Immunity*, 9(3–4), 429–436.
- Martínez-Lara, P., Martínez-Porchas, M., Gollas-Galván, T., Hernández-López, J. & Robles-Porchas, G.R. (2021) Granulomatosis in fish aquaculture: a mini review. *Reviews in Aquaculture*, 13(1), 259–268.
- Monboisse, J., Labadie, J. & Gouet, P. (1979) Purification and physicochemical properties of collagenase synthesized by a bacterium of the type *Acinetobacter* sp. *Biochimie*, 61(10), 1169–1175.
- Rainbow, L., Wilkinson, M.C., Sargent, P.J., Hart, C.A. & Winstanley, C. (2004) Identification and expression of a *Burkholderia pseudomallei* collagenase in *Escherichia coli*. *Current Microbiology*, 48(4), 300–304.
- Rajme-Manzur, D., Gollas-Galván, T., Vargas-Albores, F., Martínez-Porchas, M., Hernández-Oñate, M.Á. & Hernández-López, J. (2021) Granulomatous bacterial diseases in fish: an overview of the host's immune response. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 261, 111058.
- Rousselet, E., Stacy, N.I., Rotstein, D.S., Waltzek, T.B., Griffin, M.J. & Francis-Floyd, R. (2018) Systemic *Edwardsiella tarda* infection in a Western African lungfish (*Protopterus annectens*) with cytologic observation of heterophil projections. *Journal of Fish Diseases*, 41(9), 1453–1458.
- Ruggiero, S.M., Pilvankar, M.R. & Ford Versypt, A.N. (2017) Mathematical modeling of tuberculosis granuloma activation. *Processes*, 5(4), 79.
- Shabanzadeh, S., Shapoori, M., Sheikhzadeh, N., Nofouzi, K., Khani Oushani, A., Najafi Enferadi, M.H., ... Shahbazfar, A.A. (2016) Growth performance, intestinal histology, and biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to dietary inclusion of heat-killed *Gordonia bronchialis*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 42(1), 65–71.
- Shahi, N., Mallik, S., Sahoo, M., Chandra, S. & Singh, A. (2018) First report on characterization and pathogenicity study of emerging *Lactococcus garvieae* infection in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*

(Walbaum), from India. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(4), 1039–1048.

Vargas-Albores, F., Martínez-Córdova, L.R., Hernández-Mendoza, A., Cicala, F., Lago-Lestón, A. & Martínez-Porchas, M. (2021) Therapeutic modulation of fish gut microbiota, a feasible strategy for aquaculture? *Aquaculture*, 544, 737050.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Martínez-Lara, P., Hernández-López, J., Garibay-Valdez, E., Medina-Félix, D., Martínez-Porchas, M., Coronado-Molina, D., Ortiz-Luna, R.J., Puerto, J.H., Gracia-Valenzuela, M.H. et al. (2023) Microbiota attached to and encapsulated by granulomas dissected from tilapia spleen: a case report. *Aquaculture, Fish and Fisheries*, 3, 96–101. <https://doi.org/10.1002/aff.2.88>

5. PERFIL METAGENÓMICO DE LESIONES GRANULOMATOSAS BACTERIANAS EN TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) DE GRANJAS DE CULTIVO

Pablo Martínez Lara¹, Jorge Hernández López², Marcel Martínez Porchas¹, Francisco Vargas-Albores¹, Estefanía Garibay Valdez¹

1 Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, CIAD, Hermosillo, Mexico

2 Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, CIBNOR, Hermosillo, Mexico

Artículo en revisión

1 Introducción

La acuicultura se ha convertido en una de las actividades económicas de mayor crecimiento a nivel mundial, con la tilapia (*O. niloticus*) destacándose como una de las especies más cultivadas debido a su adaptabilidad, rápido crecimiento y alta demanda en el mercado (Fitzsimmons, 2000). En México, la tilapia representa un componente esencial en la producción de alimentos y en la generación de empleo, especialmente en regiones rurales y costeras donde se concentra la mayoría de las granjas acuícolas (CONAPESCA, 2022b). Sin embargo, el incremento en la producción ha venido acompañado de diversos desafíos sanitarios, siendo las enfermedades infecciosas una de las principales amenazas para la sostenibilidad de la industria acuícola.

Entre las enfermedades que afectan a la tilapia, las lesiones granulomatosas han surgido como un problema significativo en los sistemas de cultivo intensivo. Estas lesiones, que resultan de una respuesta inflamatoria crónica del organismo, son indicativas de la presencia de infecciones bacterianas persistentes, que pueden comprometer la salud de los peces y, en última instancia, la rentabilidad de las operaciones acuícolas (Gauthier and Rhodes, 2009; Martínez-Lara *et al.*, 2021). Los granulomas se forman como una estrategia del sistema inmune para contener a los patógenos, pero su presencia también puede reflejar la incapacidad del organismo para erradicar completamente la infección (Ramakrishnan, 2012).

La identificación y caracterización de los agentes causantes de estas lesiones ha sido tradicionalmente limitada por el uso de técnicas de cultivo microbiológico, las cuales no siempre logran detectar la diversidad total de microorganismos presentes en los tejidos afectados (J Handelsman, 2004). En respuesta a estas limitaciones, la metagenómica ha emergido como una herramienta poderosa que permite analizar de manera exhaustiva las comunidades microbianas en muestras complejas, sin necesidad de cultivo previo. Este enfoque, basado en la secuenciación del gen ARNr 16S, proporciona una visión detallada de la composición taxonómica y funcional de los microbiomas asociados a las lesiones granulomatosas, permitiendo identificar patógenos emergentes y comprender mejor las interacciones microbianas que podrían estar involucradas en la patogénesis (Gu *et al.*, 2019).

El presente estudio tiene como objetivo perfilar metagenómicamente las lesiones granulomatosas bacterianas en tilapia de granjas de cultivo en México, utilizando la secuenciación de la región V4

del gen ARNr 16S para identificar y caracterizar los microorganismos presentes. Mediante esta investigación, se busca no solo detectar los patógenos asociados a estas lesiones, sino también aportar conocimiento que permita mejorar las estrategias de diagnóstico y manejo sanitario en la acuicultura, contribuyendo así a la sostenibilidad y competitividad de esta industria en el país.

2 Antecedentes

Las enfermedades granulomatosas en la acuicultura representan un problema grave para la producción de tilapia (*O. niloticus*) en todo el mundo especialmente en México, donde es la principal especie de agua dulce producida a nivel nacional (Platas-Rosado, 2017; CONAPESCA, 2022a; Rajme-Manzur *et al.*, 2023). Este problema abarca desde el tipo de agente etiológico que causa las enfermedades, las pérdidas económicas sufridas y la detección temprana de estas (Martínez-Lara *et al.*, 2021). En los últimos años, se han reportado casos en México (Ortega *et al.*, 2018; Del Rio-Rodriguez *et al.*, 2021).

Un granuloma es una colección organizada de células inflamatorias, que típicamente consiste en macrófagos dispuestos de manera compacta para aislar al agente causante del tejido sano. Los granulomas pueden tener orígenes infecciosos o no infecciosos (Ramakrishnan, 2012; Shah *et al.*, 2017; Pavludi *et al.*, 2023). Los granulomas infecciosos más estudiados en humanos y peces son aquellos causados por micobacterias (James, 2000; Ramakrishnan, 2013; Meijer, 2016; Madigan *et al.*, 2017; Pavludi *et al.*, 2023).

El campo de la biología y la ecología microbiana ha avanzado significativamente con la llegada de las tecnologías de NGS (por sus siglas en inglés) desde 2005. Posteriormente, las NGS han encontrado una amplia aplicación clínica, notablemente en la detección y comprensión de enfermedades granulomatosas en humanos (Gu *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2023) y, más recientemente, en especímenes de acuicultura (Pavludi *et al.*, 2023; Sun *et al.*, 2023). Se ha empleado para descubrir la verdadera diversidad microbiana que de otro modo pasaría desapercibida al utilizar métodos tradicionales de cultivo (Jo Handelsman, 2004). Las heridas crónicas vinculadas a infecciones microbianas se han convertido en un punto focal de la investigación clínica, ya que los métodos tradicionales de detección de patógenos dependen en gran medida de técnicas y

condiciones de laboratorio. La secuenciación metagenómica de próxima generación ofrece la promesa de una detección de patógenos más rápida y precisa (Li *et al.*, 2023).

La metagenómica ha sido ampliamente utilizada en microbiología ambiental (Vieites *et al.*, 2008; Mocali and Benedetti, 2010; Zhang *et al.*, 2021) y se ha convertido en el estándar de oro para la investigación del microbioma intestinal humano (Wang *et al.*, 2015). Además, numerosos estudios han demostrado la efectividad de los análisis metagenómicos en el tracto gastrointestinal de la tilapia (Younes *et al.*, 2023; Gong *et al.*, 2024; Medina-Félix *et al.*, 2024) y otras especies de peces (Yukgehnaish *et al.*, 2020; Johny *et al.*, 2021). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue emplear la secuenciación metagenómica de próxima generación en ADN extraído de lesiones granulomatosas del bazo de tilapia provenientes de granjas acuícolas con sospecha de enfermedades granulomatosas. Este enfoque tenía como objetivo investigar la presencia de patógenos conocidos por causar granulomas y comparar el microbioma dentro de la lesión utilizando las secuencias de la región variable V4 del gen ARNr 16S.

3 Materiales y Métodos

3.1 Muestreo

Se realizó un análisis diagnóstico sanitario en tilapia (*O. niloticus*); las muestras consistieron en tejido esplénico con lesiones granulomatosas, las cuales fueron recolectadas asépticamente de tres granjas distintas situadas en los estados mexicanos de Morelos (MOR) en 2015, Sinaloa (SIN) en 2017 y Chiapas (CHI) en 2022. Las muestras de MOR se obtuvieron de lesiones granulomatosas en tilapias que pesaban entre 150-180 g y fueron proporcionadas por el Comité Estatal de Sanidad Acuícola del Estado de Morelos (CESAEM). Las muestras de SIN fueron bazos de tilapias clínicamente enfermas (170-180 g), que mostraban formaciones granulomatosas obtenidas de una granja comercial. De manera similar, las muestras de CHI comprendieron lesiones granulomatosas de bazos de tilapias (150-160 g). Todas las muestras se transportaron refrigeradas en tubos cónicos sellados de 15 ml al Laboratorio de Referencia, Análisis y Diagnóstico en Sanidad Acuícola

(LARADSA) del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) para su análisis.

3.2 Extracción de ADN para Análisis Metagenómico

Las muestras de bazo se lavaron minuciosamente con agua estéril libre de nucleasas y de grado molecular. Posteriormente, se disecaron varios nódulos de 1-2 mm de cada muestra utilizando un kit de disección previamente esterilizado. Los granulomas se lisaron mecánicamente utilizando un Fastprep 5G con Lysing Matrix A (MP Biomedicals, USA). La extracción de ADN se realizó utilizando el kit FASTDNA™ Spin (MP Biomedicals, USA). La región hipervariable V4 del gen ARNr 16S se amplificó utilizando los cebadores 515 F (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') y 806 R (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3') con la secuencia adaptadora, un código de ocho bases específico para cada muestra, un pad, y un linker, siguiendo el método descrito por Caporaso et al. (2011) y Kozich et al. (2013) (Martínez-Lara *et al.*, 2022). Las condiciones de termociclado incluyeron un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 95 °C durante 20 segundos, 55 °C durante 15 segundos, 72 °C durante 5 minutos y una extensión final de 72 °C durante 7 minutos. Posteriormente, los productos de PCR se purificaron utilizando el kit de normalización de placas SequalPrep, se cuantificaron y se agruparon en concentraciones equimolares. Las concentraciones de las muestras individuales y de la biblioteca final se determinaron por fluorometría utilizando el kit Qubit dsDNA HS (Invitrogen, USA). Se incluyó una biblioteca de control PhiX, y la secuenciación se realizó en una plataforma MiSeq utilizando el kit de reactivos Miseq v2 (Illumina, USA).

3.3 Procesamiento de Datos Metagenómicos

Los datos iniciales de secuencias crudas se importaron en QIIME2 y se desmultiplexaron. Posteriormente, se utilizó un pipeline estándar de QIIME2 para eliminar lecturas de baja calidad, fusionar, eliminar el ruido de las lecturas y descartar lecturas quiméricas utilizando DADA2

(Callahan *et al.*, 2016; Bolyen *et al.*, 2019). Se realizaron cortes de 2 pb en los extremos 5'-3' y de 80 pb en los extremos 3'-5' para el filtrado de las muestras, asegurando una longitud mínima de 170 pb y secuencias de alta calidad (valor de calidad Phred ≥ 30). Se realizó una exploración inicial de la composición taxonómica utilizando SILVA 132 para 16S como base de datos de referencia para alinear las secuencias resultantes. A través de la clasificación taxonómica, se llevó a cabo un proceso de filtrado que eliminó secuencias no asignadas y mínimamente representadas, obteniendo las más representativas. Además, se realizaron análisis de diversidad mediante dos enfoques: diversidad alfa y beta.

La profundidad de secuenciación empleada para calcular las métricas de diversidad alfa se estableció en 10,000 lecturas por muestra. La diversidad alfa se estimó utilizando los índices Chao1, Shannon y Fisher en QIIME2, y las diferencias significativas se evaluaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis ($P < 0.05$). Esto involucró la asignación taxonómica de las lecturas y el cálculo de la abundancia relativa. Adicionalmente, se aplicó un pipeline de PICRUSt2 para la predicción metagenómica funcional (Douglas *et al.*, 2019). La tabla de abundancia de variantes de secuencias de amplicón (ASV: Amplicon variant sequence) y las secuencias representadas se utilizaron como entrada para evaluar las predicciones funcionales. Las asignaciones taxonómicas de ASV se realizaron utilizando el comando “classify-consensus-blast” (Camacho *et al.*, 2009) en UTOs (Unidad taxonómica operativa) del gen ARNr 16S agrupados al 99% de similitud dentro de la base de datos SILVA 132 (Quast *et al.*, 2012). Los siete niveles taxonómicos se utilizaron para generar gráficos de barras de la abundancia relativa de los taxa; se excluyeron las lecturas no asignadas y aquellos ASVs con un número total de lecturas menor al 0.001%. La diversidad beta se evaluó utilizando análisis de coordenadas principales (PCoA: Principle coordinate analysis) basado en las métricas de distancia Bray Curtis, Jaccard, y Unifrac filogenéticas ponderadas y no ponderadas. La visualización de resultados se realizó utilizando MicrobiomeAnalyst 2.0 (<https://www.microbiomeanalyst.ca/>).

Se realizó una comparación estadística de la composición de la comunidad microbiana mediante el análisis de varianza multivariado permutacional (PERMANOVA).

4 Resultados y Discusión

4.1 Análisis Metagenómico

Los filos más dominantes en las lesiones granulomatosas encontradas en las muestras de SIN y CHI fueron Proteobacteria (99.88%) y Firmicutes (98.14%), respectivamente. Los resultados revelaron una diversidad inesperada en las muestras de granulomas de MOR, registrando más de 15 filos; sin embargo, solo 3 filos diferentes, incluyendo Proteobacteria (45.08%), Actinobacteria (34.79%) y Firmicutes (10.03%), constituyeron $\geq 90\%$ de la abundancia relativa (Figura 1). Se reportaron diferencias significativas (prueba de Kruskal-Wallis) entre las muestras ($p = 0.034$) en los índices de diversidad alfa de Shannon, Chao1 y Fisher (Figura 2), alineándose con los porcentajes de frecuencia relativa observados que se muestran en la Figura 1. Además, la diversidad beta reveló diferencias significativas ($p = 0.004$) entre las comunidades bacterianas en todas las muestras de lesiones granulomatosas de tilapia.

Los resultados obtenidos en el presente estudio proporcionan una visión detallada a nivel de filo de la composición bacteriana asociada a las lesiones granulomatosas en tilapia (*O. niloticus*) provenientes de diferentes granjas de cultivo en México. La dominancia de los filos Proteobacteria y Firmicutes en las muestras de SIN y CHI, respectivamente, es consistente con estudios previos que han reportado la prevalencia de estos filos en infecciones bacterianas en peces (Gauthier and Rhodes, 2009; Ortega *et al.*, 2018; Rodrigues *et al.*, 2019; Vanamala *et al.*, 2022). La alta abundancia de Proteobacteria en SIN (99.88%) podría estar relacionada con la presencia de patógenos conocidos dentro de este filo, como *Aeromonas* y *Pseudomonas*, que son agentes comunes en enfermedades en peces (Austin and Austin, 2016). Sin embargo, un patógeno de particular relevancia es *E. anguillarum*, una bacteria recientemente reconocida como una especie dentro del género *Edwardsiella*, la cual pertenece al filo Proteobacteria. *E. anguillarum* ha sido aislada en lesiones granulomatosas en varias especies de peces, incluyendo la tilapia (Oh *et al.*, 2020; Armwood *et al.*, 2022). Su capacidad para invadir tejidos y provocar la formación de granulomas es un aspecto crítico que destaca su importancia como patógeno emergente en la acuicultura.

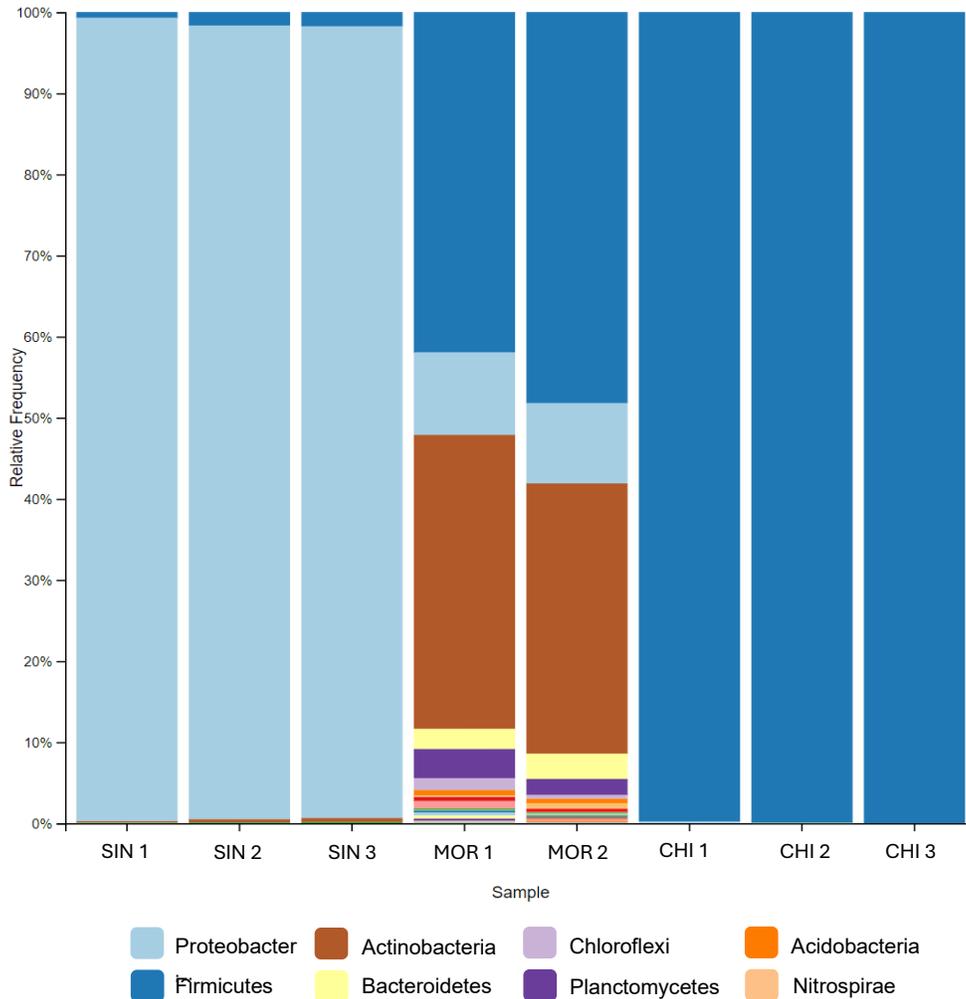


Figura 1. Abundancia relativa de filios bacterianos en diferentes lesiones granulomatosas de tilapia de distintas granjas en México

El filo Firmicutes, aunque menos diverso que Proteobacteria, incluye géneros de bacterianas que son patógenas para los peces como lo son *Streptococcus* y *Lactococcus* los cuales han sido identificados como causantes de infecciones severas en sistemas de acuicultura (Evans *et al.*, 2006; Vendrell *et al.*, 2006). Un estudio realizado por Ortega *et al.* (2018) reportó por primera vez en México la presencia de *S. iniae* en tilapias que presentaban lesiones granulomatosas. Este patógeno es conocido por causar septicemia y formación de granulomas en múltiples tejidos, lo que conduce a un alto índice de mortalidad y pérdidas económicas (Heckman *et al.*, 2022). Adicionalmente, *S. agalactiae* es otra bacteria del filo Firmicutes que ha sido implicada en infecciones en peces (Pretto-Giordano *et al.*, 2010; Amal and Zamri-Saad, 2011). Se ha reportado que esta especie

produce brotes de infecciones con la presencia de lesiones granulomatosas en poblaciones de tilapia (Asencios *et al.*, 2016). Este patógeno es especialmente virulento en condiciones de alta densidad de cultivo y temperaturas elevadas, lo que subraya la necesidad de estrategias de manejo eficaces (Iregui *et al.*, 2014).

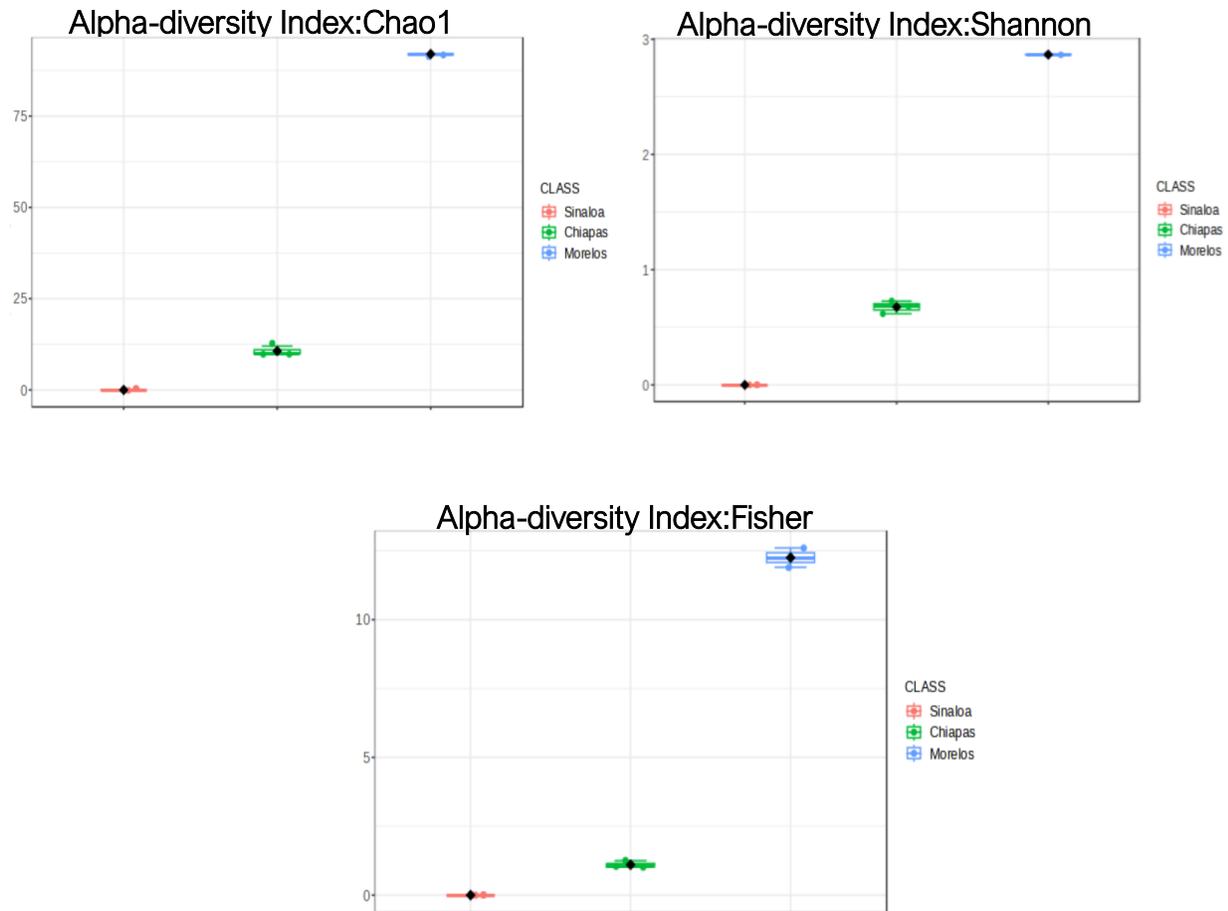


Figura 2. Índice de diversidad alfa en lesiones granulomatosas de tilapia de distintas granjas en México.

El filo Actinobacteria incluye bacterias Gram positivas de crecimiento lento que son conocidas por causar enfermedades crónicas en peces. Entre los géneros más relevantes de este filo se encuentran *Mycobacterium* y *Nocardia*, ambos ampliamente reconocidos como patógenos en sistemas de acuicultura. Las especies de *Mycobacterium* son bien conocidas por su capacidad de causar infecciones granulomatosas crónicas en peces, una condición conocida como "micobacteriosis"

(Tsiolakkis *et al.*, 2023). Puk *et al.* (2018) documentaron la presencia de 4 especies de *Mycobacterium* en peces ornamentales, destacando su capacidad de inducir granulomas en múltiples órganos, incluidos el hígado, los riñones y la piel. La micobacteriosis es particularmente problemática debido a su curso subclínico, lo que permite que la infección persista y se propague dentro de los sistemas de desarrollo. *Nocardia spp.* también ha sido reportado como un patógeno significativo en peces, causante de una enfermedad conocida como nocardiosis, caracterizada por la formación de granulomas multifocales (Martínez-Lara *et al.*, 2021; Rajme-Manzur *et al.*, 2021). Al igual que *Mycobacterium*, las especies de *Nocardia* son difíciles de erradicar una vez establecidas, y las infecciones tienden a ser crónicas y debilitantes para los peces afectados. Ambos géneros representan un desafío significativo para la acuicultura, no solo por su capacidad de inducir enfermedades crónicas, sino también por la dificultad de diagnosticar y tratar estas infecciones de manera efectiva.

Por otro lado, las muestras de MOR mostraron una diversidad filogenética significativamente mayor, con la identificación de más de 15 filos diferentes. Esta diversidad podría reflejar una exposición a un ambiente microbiano más complejo o una respuesta inmunitaria más diversificada en las tilapias de esta región. Sin embargo, la concentración de la abundancia relativa en solo tres filos principales (Proteobacteria, Actinobacteria, y Firmicutes) sugiere que, a pesar de la diversidad observada, un número limitado de grupos bacterianos domina las comunidades microbianas en las lesiones granulomatosas (Figura 1).

Las diferencias significativas observadas en los índices de diversidad alfa (Shannon, Chao1 y Fisher) entre las muestras sugieren que la estructura de la comunidad bacteriana varía considerablemente entre las diferentes granjas. Esta variación puede estar influenciada por factores específicos de cada entorno de cultivo, como la calidad del agua, el manejo de la alimentación y las prácticas sanitarias (Martínez-Lara *et al.*, 2021). La diversidad alfa más alta registrada en las muestras de MOR podría estar asociada con una mayor heterogeneidad en el entorno microbiano o con la presencia de múltiples agentes patógenos que provocan respuestas inmunitarias diferenciadas en los peces (Figura 2).

Adicionalmente, la diversidad beta reveló diferencias significativas entre las comunidades bacterianas de las diferentes muestras ($p = 0.004$), lo que sugiere que la composición microbiana en las lesiones granulomatosas no solo varía en términos de riqueza y diversidad, sino también en la estructura comunitaria (Figura 5). Estas diferencias podrían estar relacionadas con variaciones

en la exposición a diferentes bacterias patógenas o con diferencias en la susceptibilidad de los peces a infecciones en función de factores genéticos o ambientales.

5 Conclusión

El estudio del perfil metagenómico de las lesiones granulomatosas bacterianas en tilapia (*O. niloticus*) de granjas de cultivo en México ha revelado una compleja diversidad microbiana en estas lesiones, destacando la predominancia de los filos Proteobacteria, Firmicutes y Actinobacteria. Estos hallazgos subrayan la importancia de estos grupos bacterianos en la patogénesis de las infecciones granulomatosas en tilapia, donde patógenos emergentes como *E. anguillarum* y especies ya conocidas como *S. iniae*, *Mycobacterium* y *Nocardia* juegan un papel central.

Las diferencias significativas en la estructura de las comunidades microbianas observadas entre las muestras de diferentes granjas sugieren que las condiciones específicas de cada entorno de cultivo, como la calidad del agua y las prácticas de manejo, pueden influir en la diversidad y composición bacteriana de las lesiones granulomatosas. Esta variabilidad también podría estar relacionada con la susceptibilidad diferencial de las poblaciones de tilapia a las infecciones, lo que resalta la necesidad de enfoques de manejo sanitario personalizados para cada granja.

Los resultados de este estudio proporcionan información crucial para la mejora de las estrategias de diagnóstico y manejo de enfermedades en la acuicultura, especialmente en relación con la detección de patógenos y la comprensión de las interacciones microbianas en las lesiones granulomatosas. La implementación de técnicas metagenómicas en la vigilancia sanitaria de granjas acuícolas puede ofrecer una herramienta poderosa para la identificación temprana de patógenos, permitiendo una respuesta más rápida y eficaz a las amenazas sanitarias emergentes. Además, el conocimiento generado a partir de este estudio puede contribuir significativamente a la sostenibilidad y competitividad de la industria acuícola en México, al facilitar la implementación de prácticas de manejo que minimicen el impacto de las enfermedades infecciosas en la producción de tilapia.

6. RESULTADOS Y DISCUSION GENERAL

El estudio se centró en la identificación de bacterias patógenas responsables de la formación de lesiones granulomatosas en tilapia (*O. niloticus*) cultivada en granjas acuícolas mexicanas. Utilizando técnicas de secuenciación masiva y análisis metagenómico, se evaluaron muestras de tilapia procedentes de tres diferentes regiones del país: Morelos (MOR), Sinaloa (SIN) y Chiapas (CHI). Estas muestras presentaban lesiones granulomatosas que indicaban infecciones bacterianas crónicas.

Las muestras de tejido esplénico de tilapia recolectadas en las tres granjas se analizaron mediante un enfoque metagenómico, lo que permitió identificar una diversidad bacteriana. Los filos más predominantes fueron Proteobacteria, Firmicutes y Actinobacteria, aunque se observaron variaciones importantes en la composición microbiana entre las diferentes muestras.

En las muestras de SIN, Proteobacteria fue el filo dominante con un 99.88% de abundancia relativa, lo que coincide con la identificación de *E. anguillarum* en esas mismas muestras a través de PCR en tiempo real. *E. anguillarum* es un patógeno recientemente reconocido que está emergiendo en la acuicultura. Este patógeno tiene una alta capacidad para invadir tejidos y formar granulomas, lo que lo convierte en una amenaza importante para los sistemas de producción acuícola.

Las muestras de CHI mostraron una predominancia del filo Firmicutes (98.14%), con una fuerte representación del género *Streptococcus*, particularmente *S. agalactiae*. Esta bacteria es conocida por causar infecciones severas en peces, especialmente en condiciones de alta densidad de cultivo. En estudios previos, se ha documentado la presencia de *S. agalactiae* en poblaciones de tilapia afectadas por granulomas en México, lo que subraya su virulencia y potencial de causar brotes infecciosos masivos.

Por otro lado, las muestras de MOR revelaron una diversidad microbiana mayor, con más de 15 filos identificados, aunque solo tres (entre ellos Proteobacteria y Actinobacteria) constituían más del 90% de la abundancia relativa. Se encontró que *N. asteroides*, perteneciente al filo Actinobacteria, estaba presente en estas muestras, siendo responsable de la nocardiosis, una enfermedad crónica en peces que se caracteriza por la formación de granulomas multifocales.

Además, los análisis de diversidad alfa y beta revelaron diferencias significativas entre las comunidades bacterianas de las diferentes muestras. Las muestras de MOR presentaron la mayor

diversidad alfa, lo que sugiere un entorno microbiano más heterogéneo o una respuesta inmunitaria más variada en las tilapias de esta región. Las diferencias en la diversidad beta indicaron que la estructura de la comunidad bacteriana variaba considerablemente entre las diferentes granjas, influenciada por factores como la calidad del agua y las prácticas de manejo.

Los resultados obtenidos proporcionan una comprensión más profunda de la composición bacteriana asociada a las lesiones granulomatosas en tilapia, identificando patógenos clave que están afectando a la acuicultura mexicana. El filo Proteobacteria, ampliamente representado en las muestras de SIN, incluye varios géneros patógenos como *Aeromonas* y *Pseudomonas*, pero el aislamiento de *E. anguillarum* en lesiones granulomatosas es particularmente notable, ya que es la primera vez que se reporta esta bacteria como agente causal de granulomas en tilapia en México. Esto pone de relieve su relevancia emergente como patógeno de preocupación en la acuicultura.

De manera similar, la dominancia de Firmicutes en las muestras de CHI refleja la presencia de patógenos como *S. agalactiae*, cuya capacidad para causar enfermedades en condiciones de cultivo intensivo subraya la necesidad de implementar estrategias de manejo adecuadas para evitar la propagación de infecciones.

El hallazgo de *N. asteroides* en las muestras de MOR representa un reto adicional para la industria acuícola, dado que la nocardiosis es una enfermedad difícil de controlar debido a su naturaleza crónica y a la capacidad de las bacterias para persistir en el sistema inmunológico de los peces. Este patógeno, junto con las otras bacterias identificadas, resalta la complejidad de las infecciones bacterianas en tilapia y la importancia de adoptar medidas de vigilancia sanitaria más rigurosas para mitigar su impacto en la producción acuícola.

Los datos también sugieren que las diferencias en la diversidad microbiana observadas entre las diferentes granjas pueden estar asociadas a factores ambientales específicos de cada región, como la calidad del agua y las prácticas de manejo. Esto sugiere que mejorar estas condiciones podría reducir la susceptibilidad de los peces a infecciones bacterianas crónicas.

7. CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral han permitido avanzar en el conocimiento sobre las enfermedades granulomatosas en la acuicultura de tilapia en México. A través del uso de técnicas avanzadas de secuenciación metagenómica, se ha logrado identificar una diversidad inesperada de microorganismos asociados con lesiones granulomatosas, subrayando la complejidad microbiana que subyace a estas infecciones.

La identificación de *E. anguillarum*, *N. asteroides* y *S. agalactiae* como patógenos involucrados en la formación de granulomas en tilapia, constituye un hallazgo relevante, ya que estos no habían sido previamente asociados con tales infecciones en la acuicultura mexicana. Además, se comprobó la capacidad patógena de estas bacterias mediante un reto experimental, provocando la muerte de los organismos y recuperando e identificándolas de nuevo en órganos blanco Este descubrimiento no solo resalta la importancia de una vigilancia sanitaria más rigurosa en las granjas acuícolas, sino que subraya la necesidad de desarrollar estrategias de manejo más eficaces para prevenir la propagación de estas infecciones.

Además, los estudios sobre la microbiota asociada a las lesiones granulomatosas han revelado que estas estructuras pueden albergar una comunidad microbiana diversa, lo que sugiere la posibilidad de interacciones complejas entre los patógenos primarios y otras bacterias presentes en el entorno. Este hallazgo abre nuevas líneas de investigación sobre el papel de la microbiota en la patogénesis de las enfermedades granulomatosas y su impacto en la salud de los peces. La implementación de técnicas metagenómicas en la vigilancia sanitaria de granjas acuícolas se perfila como una herramienta indispensable para la identificación temprana de patógenos y la prevención de brotes de enfermedades, lo que en última instancia contribuirá a la sostenibilidad y competitividad de la industria acuícola en México.

8. RECOMENDACIONES

Continuar con los muestreos en las diferentes granjas acuícolas del país en búsqueda de la presencia de tilapias con lesiones granulomatosas.

Seguir con estudios metagenómicos para conocer las poblaciones que interactúan dentro de las lesiones granulomatosas, así como la comparativa de las poblaciones en estómago e intestino.

Utilizar distintas concentraciones de infección, así como diferentes tallas de tilapia con el fin de conocer el proceso de infección en distintas etapas biológicas de tilapia.

Ampliar los medios de cultivo y pruebas bacteriológicas para los distintos aislados bacterianos y así aumentar la información fenotípica disponible.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Tawwab M. 2012. Effects of dietary protein levels and rearing density on growth performance and stress response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *International Aquatic Research*, 4, 3.
- Adams A. and Thompson K. D. 2011. Development of diagnostics for aquaculture: challenges and opportunities. *Aquaculture Research*, 42, 93-102.
- Adams D. O. 1974. The structure of mononuclear phagocytes differentiating in vivo: I. Sequential fine and histologic studies of the effect of Bacillus Calmette-Guerin (BCG). *American Journal of Pathology*, 76, 17.
- Adeolu M., Alnajjar S., Naushad S. and S. Gupta R. 2016. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, 5575-5599.
- Alberts B. 2011. Biología molecular de la célula. 5a edición. Barcelona: Ed. Omega. Barcelona.
- Amal M. and Zamri-Saad M. 2011. Streptococcosis in tilapia (*Oreochromis niloticus*): a review. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 34, 195-206.
- Arellano J. L. P. (2019). *Sisinio de Castro. Manual de Patología General* (8th ed.). Elsevier.
- Armougom F. and Raoult D. 2009. Exploring microbial diversity using 16S rRNA high-throughput methods. *Journal of Computer Science and Systems Biology*, 2, 74-92.
- Armwood A. R., Griffin M. J., Richardson B. M., Wise D. J., Ware C. and Camus A. C. 2022. Pathology and virulence of *Edwardsiella tarda*, *Edwardsiella piscicida*, and *Edwardsiella anguillarum* in channel (*Ictalurus punctatus*), blue (*Ictalurus furcatus*), and channel x blue hybrid catfish. *Journal of Fish Diseases*, 45, 1683-1698.
- Asencios Y. O., Sánchez F. B., Mendizábal H. B., Pusari K. H., Alfonso H. O., Sayán A. M., Figueiredo M. A. P., Manrique W. G., de Andrade Belo M. A. and Chaupe N. S. 2016. First report of *Streptococcus agalactiae* isolated from *Oreochromis niloticus* in Piura, Peru: Molecular identification and histopathological lesions. *Aquaculture Reports*, 4, 74-79.
- Austin B. 1999. Emerging bacterial fish pathogens. *European Association of Fish Pathologists Bulletin*, 19, 231-234.
- Austin B. and Austin D. A. 2016. *Bacterial Fish Pathogens: disease of farmed and wild fish*. Springer.
- Bakaletz L. O. 2004. Developing animal models for polymicrobial diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 552-568.
- Bakkemo K. R., Mikkelsen H., Bordevik M., Torgersen J., Winther-Larsen H. C., Vanberg C., Olsen R., Johansen L.-H. and Seppola M. 2011. Intracellular localisation and innate immune responses following *Francisella noatunensis* infection of Atlantic cod (*Gadus morhua*)

macrophages. *Fish and Shellfish Immunology*, 31, 993-1004.

Becerra-Dorame M., Martínez-Córdova L., Martínez-Porchas M. and Lopez-Elías J. 2011. Evaluation of autotrophic and heterotrophic microcosm-based systems on the production response of *Litopenaeus vannamei* intensively nursed without Artemia and with zero water exchange. *Israeli Journal of Aquaculture Bamidgeh*, 63, 1-7.

Bercovier H., Kafri O. and Sela S. 1986. Mycobacteria possess a surprisingly small number of ribosomal RNA genes in relation to the size of their genome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 136, 1136-1141.

BioRender B. 2022. BioRender. In.

Birkbeck T., Bordevik M., Frøystad M. and Baklien Å. 2007. Identification of *Francisella* sp. from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Chile. *Journal of Fish Diseases*, 30, 505-507.

Bolyen E., Rideout J. R., Dillon M. R., Bokulich N. A., Abnet C. C., Al-Ghalith G. A., Alexander H., Alm E. J., Arumugam M. and Asnicar F. 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37, 852-857.

Buján N., Toranzo A. E. and Magariños B. 2018. *Edwardsiella piscicida*: a significant bacterial pathogen of cultured fish. *Diseases of Aquatic Organisms*, 131, 59-71.

Callahan B. J., McMurdie P. J., Rosen M. J., Han A. W., Johnson A. J. A. and Holmes S. P. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13, 581-583.

Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K. and Madden T. L. 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10, 1-9.

Caporaso J. G., Lauber C. L., Walters W. A., Berg-Lyons D., Huntley J., Fierer N., Owens S. M., Betley J., Fraser L. and Bauer M. 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME Journal*, 6, 1621-1624.

Caporaso J. G., Lauber C. L., Walters W. A., Berg-Lyons D., Lozupone C. A., Turnbaugh P. J., Fierer N. and Knight R. 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 4516-4522.

Chatterjee S. and Haldar S. 2012. *Vibrio* related diseases in aquaculture and development of rapid and accurate identification methods. *Journal of Marine Science: Research and Development*, 1, 1-7.

Clay H., Volkman H. E. and Ramakrishnan L. 2008. Tumor necrosis factor signaling mediates resistance to mycobacteria by inhibiting bacterial growth and macrophage death. *Immunity*, 29, 283-294.

CONAPESCA. (2022a). *Anuario estadístico de acuicultura y pesca 2021*. Secretaría de Agricultura, Ganadería. Retrieved from https://nube.conapesca.gob.mx/sites/cona/dgppe/2021/ANUARIO_ESTADISTICO_DE_ACUACULTURA_Y_PESCA_2021.pdf

CONAPESCA. (2022b). *Informe de la producción acuícola en México*. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. <https://www.gob.mx/conapesca>

Cox F. 2001. Concomitant infections, parasites and immune responses. *Parasitology*, 122, S23-

S38.

- da Costa A. R., Chideroli R. T., Lanes G. C., Ferrari N. A., Chicoski L. M., Batista C. E., Pandolfi V. C. F., Ware C., Griffin M. J. and Dos Santos A. R. 2022. Multiplex PCR assay for correct identification of the fish pathogenic species of *Edwardsiella* genus reveals the presence of *E. anguillarum* in South America in strains previously characterized as *E. tarda*. *Journal of Applied Microbiology*, 132, 4225-4235.
- Dadar M., Dhama K., Vakharia V. N., Hoseinifar S. H., Karthik K., Tiwari R., Khandia R., Munjal A., Salgado-Miranda C. and Joshi S. K. 2016. Advances in aquaculture vaccines against fish pathogens: Global status and current trends. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, 25, 184-217.
- Dahm R. and Geisler R. 2006. Learning from small fry: the zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. *Marine Biotechnology*, 8, 329-345.
- Davis J. M. and Ramakrishnan L. 2009. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. *Cell*, 136, 37-49.
- Del Rio-Rodriguez R. E., Ramirez-Paredes J. G., Soto-Rodriguez S. A., Shapira Y., Huchin-Cortes M. D. J., Ruiz-Hernandez J., Gomez-Solano M. I. and Haydon D. J. 2021. First evidence of fish nocardiosis in Mexico caused by *Nocardia seriolae* in farmed red drum (*Sciaenops ocellatus*, Linnaeus). *Journal of Fish Diseases*, 44, 1117-1130.
- Dhar A. K., Manna S. K. and Thomas Allnut F. 2014. Viral vaccines for farmed finfish. *Virusdisease*, 25, 1-17.
- Dinh-Hung N., Dong H. T., Senapin S., Linh N. V., Shinn A. P., Pirarat N., Hirono I., Chatchaiphan S. and Rodkhum C. 2024. Infection and histopathological consequences in Siamese fighting fish (*Betta splendens*) due to exposure to a pathogenic *Mycobacterium chelonae* via different routes. *Aquaculture*, 579, 740191.
- Douglas G. M., Maffei V. J., Zaneveld J., Yurgel S. N., Brown J. R., Taylor C. M., Huttenhower C. and Langille M. G. 2019. PICRUSt2: An improved and extensible approach for metagenome inference. *BioRxiv*, 672295.
- Draper P. 1971. The walls of *Mycobacterium lepraemurium*: chemistry and ultrastructure. *Microbiology*, 69, 313-324.
- Elgandy M. Y., Sherif A. H., Kenawy A. M. and Abdelsalam M. 2022. Phenotypic and molecular characterization of the causative agents of edwardsiellosis causing Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) summer mortalities. *Microbial Pathogenesis*, 169, 105620.
- Ellis T., North B., Scott A., Bromage N., Porter M. and Gadd D. 2002. The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, 61, 493-531.
- Evans J., Klesius P. and Shoemaker C. 2006. An overview of *Streptococcus* in warmwater fish. *Aquaculture Health International*, 7, 10-14.
- Fitzsimmons. (2000). Tilapia: the most important aquaculture species of the 21st century. *Internacional Symposium On Tilapia Aquaculture*,
- Gan Z., Wang B., Zhou W., Lu Y., Zhang Y., Jian J., Wu Z. and Nie P. 2016. Molecular characterization and expression of ZAP-70 in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in response to *Streptococcus agalactiae* stimulus. *Genes & Genomics*, 38, 321-331.

- Gangadharam P. R. and Jenkins P. A. (1997). *Mycobacteria: I basic aspects* (Vol. 1). Springer Science & Business Media.
- Gauthier D. T. and Rhodes M. W. 2009. Mycobacteriosis in fishes: a review. *Veterinary Journal*, 180, 33-47.
- Geng Y., Wang K., Huang X., Chen D., Li C., Ren S., Liao Y., Zhou Z., Liu Q. and Du Z. 2012. *Streptococcus agalactiae*, an emerging pathogen for cultured ya-fish, *Schizothorax prenanti*, in China. *Transboundary and Emerging Diseases*, 59, 369-375.
- Gong J., Xu F., Li Y., He Y., Liang Z., Chen X., Zhang X., Liu L., Zhou L. and Huang X. 2024. Metagenomic analysis of intestinal microbial function and key genes responsive to acute high-salinity stress in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Gene*, 148371.
- Gu W., Miller S. and Chiu C. Y. 2019. Clinical metagenomic next-generation sequencing for pathogen detection. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 14, 319-338.
- Gu W., Talevich E., Hsu E., Qi Z., Urisman A., Federman S., Gopez A., Arevalo S., Gottschall M. and Liao L. 2021. Detection of cryptogenic malignancies from metagenomic whole genome sequencing of body fluids. *Genome Medicine*, 13, 98.
- Handelsman J. 2004. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68, 669-685.
- Handelsman J. 2004. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(4), 669-685.
- Heckman T. I., Shahin K., Henderson E. E., Griffin M. J. and Soto E. 2022. Development and efficacy of *Streptococcus iniae* live-attenuated vaccines in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 121, 152-162.
- Iregui C., Barato P., Rey A., Vasquez G. and Verjan N. 2014. Epidemiology of *Streptococcus agalactiae* and strepto-coccosis in tilapia fish (*Oreochromis* sp.). *Epidemiology I: Theory, Research and Practice*, 251-268.
- Iregui C. A., Comas J., Vasquez G. M. and Verjan N. 2016. Experimental early pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* infection in red tilapia *Oreochromis* spp. *Journal of Fish Diseases*, 39, 205-215.
- Itano T., Kawakami H., Kono T. and Sakai M. 2006a. Experimental induction of nocardiosis in yellowtail, *Seriola quinqueradiata* Temminck & Schlegel by artificial challenge. *Journal of Fish Diseases*, 29, 529-534.
- Itano T., Kawakami H., Kono T. and Sakai M. 2006b. Live vaccine trials against nocardiosis in yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Aquaculture*, 261, 1175-1180.
- James D. G. 2000. A clinicopathological classification of granulomatous disorders. *Postgraduate Medical Journal*, 76, 457-465.
- Johny T. K., Puthusseri R. M. and Bhat S. G. 2021. A primer on metagenomics and next-generation sequencing in fish gut microbiome research. *Aquaculture Research*, 52, 4574-4600.
- Jorgensen L. V. G. 2020. Zebrafish as a model for fish diseases in aquaculture. *Pathogens*, 9, 609.
- Kandi V. 2015. Human *Nocardia* infections: a review of pulmonary nocardiosis. *Cureus*, 7, e304.

- Keim P., Johansson A. and Wagner D. M. 2007. Molecular epidemiology, evolution, and ecology of *Francisella*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1105, 30-66.
- Kotob M. H., Menanteau-Ledouble S., Kumar G., Abdelzaher M. and El-Matbouli M. 2017. The impact of co-infections on fish: a review. *Veterinary Research*, 47, 1-12.
- Kozich J. J., Westcott S. L., Baxter N. T., Highlander S. K. and Schloss P. D. 2013. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 5112-5120.
- Leung K. Y., Wang Q., Yang Z. and Siame B. A. 2019. *Edwardsiella piscicida*: a versatile emerging pathogen of fish. *Virulence*, 10, 555-567.
- Lewis F. M., Marsh B. J. and von Reyn C. F. 2003. Fish tank exposure and cutaneous infections due to *Mycobacterium marinum*: tuberculin skin testing, treatment, and prevention. *Clinical Infectious Diseases*, 37, 390-397.
- Li H.-h., Zhou X.-m., Liu T., Wu R., Huang Z.-f., Sun C.-w., Liu Z.-a., Zheng S.-y., Lai W. and Lou H. 2023. The clinical value of metagenomic next-generation sequencing for rapid microbial identification of chronic granulation wound infections. *Archives of Medical Science: AMS*, 19, 1162.
- Lin P. L., Pawar S., Myers A., Pegu A., Fuhrman C., Reinhart T. A., Capuano S. V., Klein E. and Flynn J. L. 2006. Early events in *Mycobacterium tuberculosis* infection in *cynomolgus macaques*. *Infection and Immunity*, 74, 3790-3803.
- Liu Z., Lozupone C., Hamady M., Bushman F. D. and Knight R. 2007. Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Research*, 35, e120.
- Luo Q., Hiessl S. and Steinbüchel A. 2014. Functional diversity of *Nocardia* in metabolism. *Environmental Microbiology*, 16, 29-48.
- Madigan C. A., Cameron J. and Ramakrishnan L. 2017. A zebrafish model of *Mycobacterium leprae* granulomatous infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 216, 776-779.
- Maekawa S., Yoshida T., Wang P. C. and Chen S. C. 2018. Current knowledge of nocardiosis in teleost fish. *Journal of Fish Diseases*, 41, 413-419.
- Mardis E. R. 2008. Next-generation DNA sequencing methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 9, 387-402.
- Martínez-Córdova L. R., Martínez-Porchas M., Porchas-Cornejo M. A., Gollas-Galván T., Scheuren-Acevedo S., Arvayo M. A., López-Elías J. A. and López-Torres M. A. 2016. Bacterial diversity studied by next-generation sequencing in a mature phototrophic *Navicula* sp.-based biofilm promoted into a shrimp culture system. *Aquaculture Research*.
- Martínez-Lara P., Hernández-López J., Garibay-Valdez E., Medina-Félix D., Martínez-Porchas M., Coronado-Molina D., Ortiz-Luna R. J., Puerto J. H. and Gracia-Valenzuela M. H. 2022. Microbiota attached to and encapsulated by granulomas dissected from tilapia spleen: A case report. *Aquaculture, Fish and Fisheries*, 3, 96-101.
- Martínez-Lara P., Martínez-Porchas M., Gollas-Galván T., Hernández-López J. and Robles-Porchas G. R. 2021. Granulomatosis in fish aquaculture: a mini review. *Reviews in Aquaculture*, 13, 259-268.

- Martínez-Porchas M. and Vargas-Albores F. 2017. Microbial metagenomics in aquaculture: a potential tool for a deeper insight into the activity. *Reviews in Aquaculture*, 9, 42-56.
- Martinot A. J. 2018. Microbial offense vs host defense: who controls the TB granuloma? *Veterinary Pathology*, 55, 14-26.
- Medina-Félix D., Vargas-Albores F., Garibay-Valdez E., Martínez-Córdova L. R. and Martínez-Porchas M. 2024. *Oreochromis niloticus* gastrointestinal microbiota affected by the infection with *Staphylococcus haemolyticus* and *Providencia vermicola*, two emerging pathogens in fish aquaculture. *Aquaculture*, 582, 740529.
- Medini D., Serruto D., Parkhill J., Relman D. A., Donati C., Moxon R., Falkow S. and Rappuoli R. 2008. Microbiology in the post-genomic era. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 419-430.
- Meijer A. H. (2016). Protection and pathology in TB: learning from the zebrafish model. *Seminars in immunopathology*,
- Menendez M., Garcia M., Navarro M., Gonzalez-y-Merchand J., Rivera-Gutierrez S., Garcia-Sanchez L. and Cox R. 2002. Characterization of an rRNA operon (rrnB) of *Mycobacterium fortuitum* and other mycobacterial species: implications for the classification of mycobacteria. *Journal of Bacteriology*, 184, 1078-1088.
- Mia M. J., Mahmud R. B., Sadad M. S., Al Asad H. and Hossain R. 2022. An in-depth automated approach for fish disease recognition. *Journal of King Saud University-Computer and Information Sciences*, 34, 7174-7183.
- Mocali S. and Benedetti A. 2010. Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. *Research in Microbiology*, 161, 497-505.
- Mwainge V. M., Ogwai C., Aura C. M., Mutie A., Ombwa V., Nyaboke H., Oyier K. N. and Nyaundi J. 2021. An overview of fish disease and parasite occurrence in the cage culture of *Oreochromis niloticus*: A case study in Lake Victoria, Kenya. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 24, 43-55.
- Nawaz M., Gao T., Huang K., Gouife M., Chen S., Zhu S., Ma R., Jin S., Jiang J. and Xie J. 2022. Pathogenicity, diagnosis, prevention strategies and immune response of bacterium *Nocardia seriolae*: A critical review. *Aquaculture Research*, 53, 4901-4918.
- Nielsen H. B., Almeida M., Juncker A. S., Rasmussen S., Li J., Sunagawa S., Plichta D. R., Gautier L., Pedersen A. G. and Le Chatelier E. 2014. Identification and assembly of genomes and genetic elements in complex metagenomic samples without using reference genomes. *Nature Biotechnology*, 32, 822-828.
- Nigrelli R. F. and Vogel H. 1963. Spontaneous tuberculosis in fishes and in other cold-blooded vertebrates with special reference to *Mycobacterium fortuitum* Cruz from fish and human lesions. *Zoologica*, 48, 131-143.
- Oh W. T., Jun J. W., Kim H. J., Giri S. S., Yun S., Kim S. G., Kim S. W., Kang J. W., Han S. J. and Kwon J. 2020. Characterization and pathological analysis of a virulent *Edwardsiella anguillarum* strain isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Korea. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 14.
- Ommani A. R. 2011. Strengths, weaknesses, opportunities and threats (SWOT) analysis for farming system businesses management: Case of wheat farmers of Shadervan District,

- Shoushtar Township, Iran. *African Journal of Business Management*, 5, 9448.
- Ortega C., Garcia I., Irgang R., Fajardo R., Tapia-Cammas D., Acosta J. and Avendano-Herrera R. 2018. First identification and characterization of *Streptococcus iniae* obtained from tilapia (*Oreochromis aureus*) farmed in Mexico. *Journal of Fish Diseases*, 41, 773-782.
- Ortega C., Mancera G., Enriquez R., Vargas A., Martinez S., Fajardo R., Avendano-Herrera R., Navarrete M. J. and Romero A. 2016. First identification of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* causing mortality in Mexican tilapia *Oreochromis* spp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 120, 205-215.
- Park S. B., Aoki T. and Jung T. S. 2012. Pathogenesis of and strategies for preventing *Edwardsiella tarda* infection in fish. *Veterinary Research*, 43, 1-11.
- Parma L., Candela M., Soverini M., Turrone S., Consolandi C., Brigidi P., Mandrioli L., Sirri R., Fontanillas R. and Gatta P. P. 2016. Next-generation sequencing characterization of the gut bacterial community of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fed low fishmeal based diets with increasing soybean meal levels. *Animal Feed Science Technology*, 222, 204-216.
- Pavlouidi C., Tsertou M. I., Antonopoulou E. and Katharios P. 2023. Investigation of systemic granulomatosis in cultured meagre, *Argyrosomus regius*, using clinical metagenomics. *Aquaculture*, 567, 739249.
- Petersen H. J. and Smith A. M. 2013. The role of the innate immune system in granulomatous disorders. *Frontiers in Immunology*, 4, 120.
- Platas-Rosado D. 2017. Importancia económico y social del sector acuícola en México. *Agro Productividad*, 10(2).
- Pretto-Giordano L. G., Müller E. E., Freitas J. C. d. and Silva V. G. d. 2010. Evaluation on the pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53, 87-92.
- Puk K., Banach T., Wawrzyniak A., Adaszek Ł., Zietek J., Winiarczyk S. and Guz L. 2018. Detection of *Mycobacterium marinum*, *M. peregrinum*, *M. fortuitum* and *M. abscessus* in aquarium fish. *Journal of Fish Diseases*, 41, 153-156.
- Puk K. and Guz L. 2020. Occurrence of *Mycobacterium* spp. in ornamental fish. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 27, 535-539.
- Pulido A., Iregui C., Figueroa J. and Klesius P. 2016. Estreptococosis en tilapias (*Oreochromis* spp.) cultivadas en Colombia. *Revista AquaTIC*(20).
- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J. and Glöckner F. O. 2012. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41, D590-D596.
- Rajme-Manzur D., Gollas-Galvan T., Vargas-Albores F., Martinez-Porchas M., Hernandez-Onate M. A. and Hernandez-Lopez J. 2021. Granulomatous bacterial diseases in fish: An overview of the host's immune response. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 261, 111058.
- Rajme-Manzur D., Hernandez-Lopez J., Martinez-Porchas M., Vargas-Albores F., Garibay-Valdez E., Coronado-Molina D. E., Hernandez-Onate M. A., Vazquez-Ramirez F., Velazquez-Valencia L. A. and Santacruz A. 2023. *Staphylococcus haemolyticus* and *Providencia*

vermicola Infections Occurring in Farmed Tilapia: Two Potentially Emerging Pathogens. *Animals*, 13(23), 3715.

- Ramakrishnan L. 2012. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nature Reviews Immunology*, 12, 352-366.
- Ramakrishnan L. 2013. Looking within the zebrafish to understand the tuberculous granuloma. *The New Paradigm of Immunity to Tuberculosis*, 251-266.
- Reavill D. R. and Schmidt R. E. 2012. Mycobacterial lesions in fish, amphibians, reptiles, rodents, lagomorphs, and ferrets with reference to animal models. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 15, 25-40.
- Reichley S. R., Ware C., Steadman J., Gaunt P. S., García J. C., LaFrentz B. R., Thachil A., Waldbieser G. C., Stine C. B. and Buján N. 2017. Comparative phenotypic and genotypic analysis of *Edwardsiella* isolates from different hosts and geographic origins, with emphasis on isolates formerly classified as *E. tarda*, and evaluation of diagnostic methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 55, 3466-3491.
- Ribas L. and Piferrer F. 2014. The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research. *Reviews in Aquaculture*, 6, 209-240.
- Rodrigues M. V., Dias M. F. F., Francisco C. J., David G. S., da Silva R. J. and Junior J. P. A. 2019. *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from Brazilian aquaculture: a public health problem. *Emergent Life Sciences Research*, 5, 48-55.
- Ross A. (1970). Mycobacteriosis among Pacific salmonid fishes. A symposium on diseases of fishes and shellfishes. American Fisheries Society, Special publication,
- Santos J. F., Assis C. R. D., Soares K. L. S., Rafael R. E. Q., Oliveira V. M., de Vasconcelos Filho J. E., França R. C. P., Lemos D. and Bezerra R. S. 2019. A comparative study on Nile tilapia under different culture systems: Effect on the growth parameters and proposition of new growth models. *Aquaculture*, 503, 128-138.
- Shah K. K., Pritt B. S. and Alexander M. P. 2017. Histopathologic review of granulomatous inflammation. *Journal of Clinical Tuberculosis and other Mycobacterial Diseases*, 7, 1-12.
- Sogin M. L., Morrison H. G., Huber J. A., Welch D. M., Huse S. M., Neal P. R., Arrieta J. M. and Herndl G. J. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 12115-12120.
- Soto E., Hawke J., Fernandez D. and A Morales J. 2009. *Francisella* sp., an emerging pathogen of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in Costa Rica. *Journal of Fish Diseases*, 32, 713-722.
- Streit W. R. and Schmitz R. A. 2004. Metagenomics—the key to the uncultured microbes. *Current Opinion in Microbiology*, 7, 492-498.
- Sun B.-Y., He W., Yang H.-X., Tian D.-Y., Jian P.-Y., Wu K., Yang C.-G. and Song X.-H. 2022. Increased susceptibility to *Aeromonas hydrophila* infection in grass carp with antibiotic-induced intestinal dysbiosis. *Aquaculture*, 552, 737969.
- Sun W.-w., Dong Z.-w., Zhou Y.-m., Jin F., Liu H.-c. and Fan L. 2023. Improving the identification and diagnostic efficiency of Metagenomic Next-Generation Sequencing for mycobacterial granuloma on postoperative formalin-fixed paraffin-embedded specimens. *Microbes and Infection*, 25, 105185.

- Tsiolakkis G., Lontos A., Filippas-Ntekouan S., Matzaras R., Theodorou E., Vardas M., Vairaktari G., Nikopoulou A. and Christaki E. 2023. *Mycobacterium marinum*: A case-based narrative review of diagnosis and management. *Microorganisms*, 11.
- Vadstein O., Bergh Ø., Gatesoupe F. J., Galindo-Villegas J., Mulero V., Picchiatti S., Scapigliati G., Makridis P., Olsen Y. and Dierckens K. 2013. Microbiology and immunology of fish larvae. *Reviews in Aquaculture*, 5, S1-S25.
- Vanamala P., Sindhura P., Sultana U., Vasavilatha T. and Gul M. Z. 2022. Common bacterial pathogens in fish: An overview. *Bacterial Fish Diseases*, 279-306.
- Vendrell D., Balcázar J. L., Ruiz-Zarzuela I., De Blas I., Gironés O. and Múzquiz J. L. 2006. *Lactococcus garvieae* in fish: a review. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 29, 177-198.
- Vieites J. M., Guazzaroni M.-E., Beloqui A., Golyshin P. N. and Ferrer M. 2008. Metagenomics approaches in systems microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, 33, 236-255.
- Wang W.-L., Xu S.-Y., Ren Z.-G., Tao L., Jiang J.-W. and Zheng S.-S. 2015. Application of metagenomics in the human gut microbiome. *World Journal of Gastroenterology*, 21, 803.
- Younes A., Saito H., Tani S., Ikeo R. and Kawai K. 2023. Metagenomic analysis of gut microbiome from tilapia species across several regions in Japan. *Aquaculture*, 576, 739809.
- Yukgehnaish K., Kumar P., Sivachandran P., Marimuthu K., Arshad A., Paray B. A. and Arockiaraj J. 2020. Gut microbiota metagenomics in aquaculture: factors influencing gut microbiome and its physiological role in fish. *Reviews in Aquaculture*, 12, 1903-1927.
- Zhang H., Sun Z., Liu B., Xuan Y., Jiang M., Pan Y., Zhang Y., Gong Y., Lu X. and Yu D. 2016. Dynamic changes of microbial communities in *Litopenaeus vannamei* cultures and the effects of environmental factors. *Aquaculture*, 455, 97-108.
- Zhang H., Sun Z., Liu B., Xuan Y., Jiang M., Pan Y., Zhang Y., Gong Y., Lu X., Yu D., Kumar D., Hu X., Cao G., Xue R. and Gong C. 2016. Dynamic changes of microbial communities in *Litopenaeus vannamei* cultures and the effects of environmental factors. *Aquaculture*, 455, 97-108.
- Zhang L., Chen F., Zeng Z., Xu M., Sun F., Yang L., Bi X., Lin Y., Gao Y. and Hao H. 2021. Advances in metagenomics and its application in environmental microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 12, 766364.