

Resistencia a antibióticos y presencia de plásmidos en *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis* y *Vibrio furnissii*, aislados de *Carassius auratus auratus*

Antibiotic resistance and presence of plasmids in *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis*, and *Vibrio furnissii* isolated from *Carassius auratus auratus*

Pilar Negrete Redondo*
Jorge Romero Jarero**
José Luis Arredondo Figueroa***

Abstract

We isolated and identified 70 bacterial strains from the ornate fish species *Carassius auratus*, in specimens with signs of infection. The isolated and identified bacterial species, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis*, and *Vibrio furnissii*, have been reported to cause diarrhea in humans, and the first two are considered very aggressive pathogens in *Cyprinus carpio* cultures. For this reason, antibiotics to avoid and control the presence of these bacteria have been inadequately used and abused. The uncontrolled use of antibiotics has given rise to the presence of an R-plasmid in bacteria, as a response to the environmental stress represented by these chemical compounds. When R-plasmid carrying bacteria are transmitted directly to humans, be it by direct contact with the host during handling in culture, as a pet, in consumption, or by a conjunction of all these factors, the problem exceeds aquaculture and becomes a public health issue. All the studied strains presented antibiotic resistance. We recorded resistance to more than one antibiotic, and up to seven in some cases. Furthermore, 100% of the strains carried plasmids resistant to antibiotics with molecular weights ranging from 25.7kb to 6.6 kb. The *Aeromonas hydrophila* strains presented resistance to the following antibiotics: cephalothin (CF), tetracycline (T), nitrofurantoin (NF), ampicillin (AMP), carbenicillin (CB), and kanamycin (K). The molecular weights of the plasmids found ranged from 25.7 to 6.6 kb, 24% of *Aeromonas hydrophila* carried plasmids of 14.2 kb and 21% of 22.5 kb. Plasmids of 15 to 6.9 kb were extracted from *Vibrio fluvialis* strains, 58% were of 15 kb and were resistant to CF, AMP, T, NF, CB. *Vibrio furnissii* carried plasmids ranging from 15 to 6.6 kb, 46% these strains were of 14.2 kb and presented resistance to CF, AMP, T, NF, CB, and K. The results were the same independent of the origin of the samples, be it water, food or an organism. None of the plasmids were able to transfer to *Escherichia coli* and no incompatibility group could be determined.

Key words: AQUACULTURE, RESISTANCE, ANTIBIOTICS, R-PLASMIDS, CONJUGATION, *VIBRIO FLUVIALIS*, *VIBRIO FURNISSII*, *AEROMONAS HYDROPHILA*, *CARASSIUS AURATUS*, CHEMICAL CONTROL.

Resumen

Se aislaron e identificaron 70 cepas bacterianas del riñón de peces de ornato *Carassius auratus* con signos y lesiones de infección. Las especies bacterianas aisladas e identificadas, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis* y *Vibrio furnissii*, han sido descritas como causantes de diarrea en humanos y como patógeno muy agresivo en cultivos de *Cyprinus carpio*. Por esta razón se ha hecho mal uso y abuso de antibióticos para evitar y controlar la presencia de esta bacteria en los cultivos. El uso fuera de control de los anti-

Recibido el 26 de marzo de 2003 y aceptado el 24 septiembre de 2003.

* El Hombre y su Ambiente, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calz. del Hueso 1 100, Col. Villa Quietud, México, D. F.

**Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

*** Hidrobiología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, 09340, México, D. F.

bióticos ha generado presencia de plásmidos-R en bacterias, como respuesta del estrés ambiental que estos químicos representan para éstas. Cuando las bacterias portadoras de plásmidos-R pueden transmitirlo al humano, directamente por contacto directo con el hospedero, al ser manejado durante su cultivo o como animal de compañía o a través de su ingesta o por conjugación, el problema va más allá de la acuicultura y se convierte además en un problema de salud pública. Todas las cepas estudiadas presentaron resistencias a antibióticos. Se registró resistencia a más de un antibiótico y hasta a siete antibióticos por la misma cepa. Igualmente, 100% de las cepas portaban plásmidos resistentes a antibióticos de pesos moleculares de niveles entre 25.7 a 6.6 kb. Las cepas de *Aeromonas hydrophila* presentaron resistencia a los antibióticos: cefalotina (CF), tetraciclina (T), nitrofurantoína (NF), ampicilina (AMP), carbacilina (CB) y kanamicina (K). Los pesos moleculares de los plásmidos encontrados oscilaron entre 25.7 a 6.6 kb, 24% de *Aeromonas hydrophila* portaban plásmidos de 14.2 kb y 21% fueron de 22.5 kb. En cepas de *Vibrio fluvialis* se extrajeron plásmidos de pesos moleculares entre 15 kb a 6.9 kb, 58% tuvieron 15 kb y fueron resistentes a cefalotina (CF), ampicilina (AMP), tetraciclina (T), nitrofurantoína (NT) y carbecilina (CB). *Vibrio furnissii* portó plásmidos entre 15 a 6.6 kb, 46% de los plásmidos en estas cepas tuvieron 14.2 kb y presentaron resistencia a: CF, AMP, T, NF, CB y K. Los resultados se presentaron independientemente de la procedencia de la muestra: Agua, alimento u organismo. Todos estos plásmidos presentaron incapacidad de establecer transferencia con *Escherichia coli*, sin que pertenecieran a ningún grupo de incompatibilidad.

Palabras clave: ACUACULTURA, RESISTENCIA, ANTIBIÓTICOS, PLÁSMIDOS-R, CONJUGACIÓN, *VIBRIO FLUVIALIS*, *VIBRIO FURNISSII*, *AEROMONAS HYDROPHILA*, *CARASSIUS AURATUS*, CONTROL QUÍMICO.

Introduction

One of the main characteristics of intensive aquaculture is the management of high densities of cultivated organisms in a reduced water volume. This is aimed at obtaining protein of animal origin for human consumption, fish flour to produce animal feed and the reproduction of ornamental fish. Under these conditions, infectious diseases represent a constant threat for successful production.¹

In Mexico, aquaculture has traditionally been developed for human consumption and for recreational purposes. However, in recent times it has gained great commercial interest as a foreign exchange strategy.

The total wholesale value of ornamental fish commerce is estimated at 900 million dollars. The estimated retail value is around 3000 dollars, whereas that of fish for human consumption is around 3 dollars per kilogram, while that of ornate fish is of 300 dollars per kilogram. The main suppliers are located in Asia and include Singapore, Thailand, Hong Kong and Malaysia.²

Apart from requiring the mobilization of large numbers of different species of fish by untrained personnel, who lack knowledge of the sanitary quality of the product and under diverse production conditions and different environments, this also implies a high health risk for the personnel involved in the large commercialization chain, especially in the case of ornamental fish.³

Introducción

Una de las principales características de la acuicultura intensiva es el manejo de altas densidades de organismos cultivados en un reducido volumen de agua, con el objeto de obtener proteína de origen animal para consumo humano, harina de pescado para la elaboración de alimento de animales y reproducción de peces de ornato. En tales condiciones las enfermedades infecciosas representan una continua amenaza para la obtención de una producción exitosa.¹

En México tradicionalmente se ha desarrollado la acuicultura con fines de consumo humano, deportivo y esparcimiento. Sin embargo, últimamente el "acuarismo" ha cobrado fuerte interés como estrategia importante de ingreso de divisas.

El valor total del comercio de peces de ornato al mayoreo se estima en 900 millones de dólares. El valor estimado de la reventa (menudeo) del pez de acuario es de tres mil dólares, mientras que el costo de pescado para consumo humano es de tres dólares por kg, aproximadamente; el precio de pez de ornato es de 300 dólares/kg. Los principales proveedores se localizan en Singapur, Tailandia, Hong Kong, Japón y Malasia.²

Esto último, además de la movilización de grandes cantidades de peces de diferentes especies en manos de personal no calificado, sin conocimiento de la calidad sanitaria del producto, en diferentes condiciones de producción y en diferentes ambientes, implica alto riesgo para la salud del personal que está involu-

The Cyprinidae family includes species such as *Carassius auratus*, popularly known as the goldfish, which, for its beauty, has a high commercial demand in Mexico.

An aquaculture farm is an open system with three important inputs: water, feed for the cultivated organisms, and the organisms themselves. From a sanitary point of view these three elements are very relevant, since it is with them that diverse contaminating and bio-aggressor elements are introduced into the system. Any of these can distort the sanitary handling conditions and alter the health-disease balance of the system, allowing for the arrival and dissemination of infectious diseases.

An aquaculture farm is an enterprise aimed at cultivating certain species with the least economical loss; hence, input, dispersion, and permanence of bacteria in the facilities must be avoided. To accomplish this, and believing that the best strategy is prevention, chemical compounds and antibiotics have been used and abused to control infections. These chemical compounds and/or antibiotics are routinely administered incorporated into the balanced feed provided to the fish,⁴⁻⁶ or are applied directly to the ponds. This is done without knowledge of whether and infectious disease is actually present, or which is the bacterial species that is infecting the production at that moment, and, should this be the case, which antibiotic and at what dosage, is required to destroy the specific bacterium.

The routine use of these practices by fish cultivators, to avoid infectious diseases in farms,¹ has resulted in an increase of resistant plasmids in diverse bacterial species which are pathogenic to fish⁷⁻¹⁴ as well as some that are pathogenic to humans. The latter, when in contact with humans, either through food or in ornamental fish, can transmit the plasmid and consequently, antibiotic resistance. This could be a public health problem, such as might arise from the conjugation of the plasmid from carrying bacteria to receptor bacteria that are pathogenic for humans, such as *Escherichia coli*.^{7,15} In some countries, such as the USA and some in Europe, this problem has already been reported.¹⁶ However, in Mexico, various fish farmers that have been studied,¹⁷ whose primary and most important economic income comes from these small artisan farms have overused and misused antibiotics incorporated in the balanced feed routinely administered to the fish while attempting to prevent and control infectious diseases in their farms. Therefore, it is important to establish the sensitivity or resistance to antibiotics that might have been acquired by the pathogenic bacteria present in *Carassius auratus auratus*, to determine whether this farming practice has generated plasmids resistant to the antibiotics used in aquaculture, and finally to establish the capacity of R-plasmid carrying bacteria of transmitting said plasmid, by conjugation, to *E. coli* receptor strains.

crada en la larga cadena de comercialización, sobre todo al ser manejada como animal de compañía.

La familia Cyprinidae incluye especies como *Carassius auratus*, popularmente conocidos como pez dorado, que por su belleza son de gran demanda comercial en México.

Una granja acuícola es un sistema abierto con tres importantes tipos de ingresos: El agua, el alimento para los organismos cultivados y los mismos organismos para cultivar. Desde un enfoque sanitario, estos elementos son de importancia, ya que con ellos ingresan al sistema diferentes elementos, como contaminantes y bioagresores que perturban las condiciones sanitarias de manejo y alteran el equilibrio salud-enfermedad en el sistema y como consecuencia la enfermedad infecciosa puede instalarse

Una granja acuícola es una empresa cuyo propósito, además de cultivar determinadas especies, es evitar las pérdidas económicas, por lo que los acuicultores deben prevenir los ingresos, la dispersión y permanencia de bacterias dentro de sus instalaciones. Para evitarlo, y creyendo que la mejor estrategia es la prevención, se ha usado y abusado de la aplicación de químicos y antibióticos para el control de las infecciones, los cuales son administrados rutinariamente e incorporados en el alimento balanceado para peces,⁴⁻⁶ o son administrados directamente dentro de los estanques de cultivo, desconociendo si existe el estado de enfermedad infecciosa, la especie de bacteria que ha infectado la producción, para el caso de que así sea, el tipo de antibiótico adecuado para destruir la bacteria específica y la dosificación necesaria.

El uso rutinario de esta práctica por parte de los acuicultores, con el objetivo de resolver el problema de enfermedades infecciosas en sus granjas acuícolas, ha resultado en un incremento de la presencia de plásmidos resistentes en diferentes especies de bacterias patógenas de peces,⁷⁻¹⁴ algunas patógenas para el humano también, y que al entrar en contacto con éste, como fuente de alimento o como animal de compañía, puede transmitirle plásmidos y como consecuencia la resistencia a antibióticos, implicando un problema de salud pública, que puede ser llevado a cabo por conjugación del plásmido de las bacterias portadoras a las bacterias receptoras, patógenas para el humano, como *Escherichia coli*.^{7,15} En algunos países, como Estados Unidos de América y algunos europeos, este problema se ha notificado.¹⁶ Sin embargo, en México varios piscicultores estudiados,¹⁷ cuyo primer y más importante ingreso económico proviene de estas pequeñas granjas rústicas, al tratar de prevenir y controlar las enfermedades infecciosas dentro de sus instalaciones, han iniciado el uso desmedido de antibióticos incorporados a alimento balanceado suministrado rutinariamente a los peces. Por tal motivo es importante establecer la sensibilidad o resistencia a los antibióticos, que como resultado de este manejo inadecuado pudieron haber adquirido las bacterias patógenas presentes en *Caras-*

Material and methods

Specimens of ornate fish *Carassius auratus auratus* with signs of infection were obtained from 14 aquaculture farms from different places of the state of Morelos, Mexico, in January 2000. Samples were taken from the culture tanks with a scoop-type net, fish were killed immediately and their viscera were exposed via an incision made along the previously disinfected surface following a lateral line from the operculum to the anus. With a previously sterilized bacteriological loop, a kidney sample was removed from each fish.^{18,19} This was sown on brain-heart infusion agar plates (BHIA) and transported to the laboratory to be incubated for 24 hours at room temperature. Afterwards, strains were purified by successively sowing on plates containing the same agar. Once purity of the strains was confirmed through the homogeneity of cell morphology observed with an optical microscope, these were Gram stained and, finally, identified by means of the Analytical Profile Index to enterobacteria y Analytical Profile Index for non-fermentative bacteria (API-20E and API-20NE)^{20, 21} techniques and complement identification tests.²²⁻²⁵

Susceptibility of the identified strains to different antibiotics was determined by the plate diffusion method.²⁶ Strains were inoculated on Luria Bertani (LB) agar plates and incubated at 30°C for 24 h. Afterwards, the colonies were placed into an assay tube containing LB broth until a turbidity of Mc Farland 0.5 was obtained.²⁷ Immediately after this, the strains were inoculated, using a sterilized swab, on Hüller-Milton agar; 15 min thereafter, Gram (-) multidiscs (Sanofi, Mexico) were placed on top. These contained: 30 µg cephalothin (CF), 30 µg chloramphenicol (CL), 30 µg ceftriaxone (CRO), 10 µg ampicillin (AM), 30 µg amikacin (AK), 30 µg trimetoprim (SXT), 30 µg cefotaxime (CTX), 30 µg nephilmecin (NET), 5 µg pefloxacin (PEF), 100 µg carbenicillin (CB), 300 µg nitrofurantoin (NF), and 10 µg gentamycin (GE). Additionally, filter-paper discs of the same characteristics impregnated with 30 µg kanamycin (K) and 30 µg tetracycline (T) were also used. They were left to incubate at 30°C for 24 hrs, and the inhibition halo was measured with Vernier calipers. Strains were classified as Resistant (R), Intermediate (I) or Susceptible (S), depending on the diameter of the inhibition halo, which included the disk diameter (6 mm).²⁸⁻³⁰

Plasmids were extracted through alkaline lysis.³¹ The strains were seeded again on LB agar plates and incubated at 30°C for 24 h. Afterwards, the colonies were transferred to 5 ml assay tubes containing LB broth, were incubated in a double water bath, under agitation at 30°C for 24 h. Two ml of this culture were transferred to a sterilized Eppendorff tube, centrifuged at 14,000 rpm during 30 s, and the supernatant was removed. The pellet from the bottom of the Eppendorff tube was resuspended in 100 µl lysozyme solution, which was resuspended in a Vortex for 1 min

sius auratus auratus, así como detectar si esta práctica acuícola ha generado plásmidos resistentes a antibióticos de uso acuícola, y por último establecer la capacidad de las bacterias portadoras de plásmidos-R de transmitirlo, por conjugación, a cepas receptoras de *E. coli*.

Material y métodos

Se obtuvieron individuos vivos manifestando signos y lesiones de infección, de cultivos de peces de ornato pertenecientes a la especie *Carassius auratus auratus*, de 14 granjas acuícolas de diferentes localidades de Morelos, México, en enero de 2000. Las muestras se extrajeron de los estanques de cultivo con una red de cuchara, inmediatamente se sacrificaron para efectuar la disección sobre la superficie ya desinfectada del cuerpo de los peces, por arriba y a lo largo de la línea lateral, desde el opérculo y hasta el ano, de tal manera que fueran expuestas las vísceras. Con una asa bacteriológica previamente esterilizada se tomó una muestra del riñón de cada uno de los peces,^{18,19} que se sembró en placas de agar de cerebro-corazón (BHIA), de esta forma las muestras fueron trasladadas al laboratorio en donde se incubaron durante 24 h a temperatura ambiente. Después se procedió a purificar las cepas por resiembras sucesivas en placas del mismo agar. Una vez comprobada la pureza de las cepas por medio de la observación de homogeneidad en morfología celular utilizando microscopio óptico, se efectuó tinción de gram, por último fueron identificadas por medio de la técnica (API-20E y API-20NE)^{20, 21} y pruebas bioquímicas de identificación complementarias.²²⁻²⁵

La susceptibilidad a diferentes antibióticos de las cepas identificadas se determinó mediante el uso del método de difusión en placa.²⁶ Las cepas se sembraron en placas de agar de Luria Bertani (LB) y se incubaron a 30°C, durante 24 h. Posteriormente las colonias se trasladaron a un tubo con 5 mL de caldo de LB, hasta obtener turbidez de 0.5 de Mc Farland.²⁷ Inmediatamente con un hisopo estéril se sembraron las cepas en placas de agar de Huller-Milton, después de 15 min se colocaron multidisco para gramnegativas, que incluye los siguientes antibióticos en las concentraciones indicadas: Cefalotina (CF) 30 µg, cloranfenicol (CL) 30 µg, ceftriaxona (CRO) 30 µg, ampicilina (AM) 10 µg, amikacina (AK) 30 µg, trimetoprim (SXT) 30 µg, cefotaxina (CTX) 30 µg, netilmecina (NET) 30 µg, pefloxacina (PEF) 5 µg, carbenicilina (CB) 100 µg, nitrofurantoína (NF) 300 µg, gentamicina 10 µg, adicionalmente se colocaron discos de papel filtro con las mismas características impregnados con los antibióticos: * Kanamicina (K) 30 µg y tetraciclina (T) 30 µg. Se incubaron a 30°C durante 24 h, después con un Vernier se midieron los halos de inhibición. Las cepas se clasificaron en resistente (R), intermedio (I) o susceptibles (S),

* Sigma Chemical

and then incubated in ice for 30 min, adding 200 μ l sodium dodecyl sulphate, mixed softly by inverting the tube and incubated for 5 min in ice. Then, 150 μ l of 3M sodium acetate were added, mixed softly by inverting the tube and incubated for 60 min, to then be centrifuged again at 14,000 rpm for 5 min. The supernatant was transferred to another sterile Eppendorff tube, adding 1,000 μ l of cold ethanol, incubated for 30 min and then centrifuged at 14,000 rpm for 30 min. The supernatant was removed, the pellet was dissolved in 100 μ l of 0.01M sodium acetate and 0.05M Tris with a pH of 8, and precipitated again in 300 μ l of cold ethanol.³¹

The supernatant was eliminated and 10 μ l of 5X sample buffer solution was added (25% saccharose, 5 mM sodium acetate, 0.05% bromophenol blue, and 0.1% SDS).

Extracts were treated with bovine pancreatic RNAase I-AS type, at a concentration of 0.01 μ g/ml, and then incubated in a double water bath at 60°C for 10 min. For electrophoresis, 10 μ l of the samples obtained were placed in the agarose gel wells at 0.6% were applied. Gels were prepared with borate TB buffer run at 0.5 X and 0.6 X of agarose. Electrophoresis was performed at 70 V and 250 W. Gels were stained for 45 min and revealed with ethidium bromide dissolved in distilled water at a concentration of 0.5 μ g/ml. Once revealed, gels were washed to eliminate excess ethidium bromide and then placed in a short-wave UV transilluminator. Gels were photographed with an instant Polaroid camera using Polaroid 667 films.

Extracts from the isolated strains were simultaneously run on gel with the known molecular weight marker: GENE RULER TM Ikb DNA LADDER.³² Finally, the relative mobility of the plasmid and the reference marker were measured by applying an inverse three rule to obtain the molecular weights of the plasmid in numbers of bases pairs in relation to the number of base pairs of the marker (10 000 bp).

To know whether the isolated strains were able to transmit the R-plasmid by conjugation to a receptor bacterium, a collection strain of *E. coli* (ATCC25922) was inoculated in lactose broth and incubated in a double water bath, with movement, at 37°C for 24 h. At the same time, all the isolated strains were inoculated in tubes containing LB broth incubated in the same way as *E. coli*, but at 22°C. On the following day, 1 mL from the *E. coli* cultivating tubes was transferred to the tubes with the isolated strains and incubated again as previously described. Afterwards three loop-full samples from each tube were inoculated in eosin methylene blue (EMB) agar plates prepared with 2.5 mg/L. Plates were finally incubated at 30°C for 24 h and observed for one week, recording growth or lack of growth of the receptor bacterium.

The whole procedure was performed with collection strains of *Aeromonas hydrophila* (ATCC35654), *Aeromonas caviae* (ATCC15468), *Vibrio alginolyticus* (ATCC177), and *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC7802).

dependiendo del diámetro de los halos, incluyendo el diámetro de los discos (6 mm).²⁸⁻³⁰

La extracción de plásmidos se efectuó utilizando la técnica de lisis alcalina.³¹ De nuevo las cepas se sembraron en placas de agar de Luria Bertani (LB) y se incubaron a 30°C durante 24 h, posteriormente las colonias que crecieron se transfirieron a tubos con 5 mL de caldo de LB, se incubaron en baño María con agitación a 30°C durante 24 h, 2 mL del cultivo fueron transferidos a otro tubo estéril Eppendorff, se centrifugó a 25 000 g durante 30 seg, el sobrenadante se removió. La pastilla que permanece en el fondo del tubo Eppendorff se resuspendió con 100 μ l de solución de lisosima, esto se resuspendió agitándose con un vortex durante 1 min, posteriormente se incubó en hielo durante 30 min, se agregó 200 μ l de duodecil sulfato de sodio, se mezcló suavemente por inversión y se incubó durante 5 min en hielo, después se añadieron 150 μ l de acetato de sodio 3 M, de nuevo se mezcló suavemente por inversión del tubo y se incubó por 60 min, nuevamente se centrifugó durante 5 min a 25 000 g, el sobrenadante se transfirió a otro tubo Eppendorff estéril, añadiendo 1 000 μ l de etanol frío, se incubó 30 min y se centrifugó 30 min a 25 000 g, el sobrenadante se removió, la pastilla se disolvió con 100 μ l de acetato de sodio 0.1 M y tris 0.05 M pH 8, reprecipitando en 300 μ l de etanol frío.³¹

El sobrenadante se eliminó y se agregaron 10 μ l de solución amortiguadora de muestra 5 X (sacarosa al 25%, acetato de sodio 5 mM, azul de bromofenol al 0.05% y SDS al 0.1%).

Las extracciones se trataron con RNAsa pancreática de bovino tipo I-AS, a concentración de 0.01 μ g/mL, se incubaron en baño María a 60°C durante 10 min. Se aplicaron 10 μ l de las muestras obtenidas en los pozos de los geles de agarosa al 0.6% para el análisis de electroforesis. Los geles se prepararon con amortiguador borato TB de corrida al 0.5 X y 0.6 X de agarosa. La electroforesis se llevó a cabo a 70 v de voltaje, 250 w de poder. Los geles fueron teñidos durante 45 min y revelados con una solución de bomuro de etidio disuelto en agua destilada a concentración de 0.5 μ g/mL. Una vez revelados los geles, se lavaron con agua durante 30 seg con el fin de eliminar excesos de bromuro de etidio, fueron colocados en un transiluminador de rayos UV de longitud de onda corta. Las fotografías de los geles fueron tomadas con transiluminador con cámara fotográfica Polaroid instantánea con cartuchos de película polaroid 667.

Las extracciones procedentes de las cepas aisladas se corrieron en gel simultáneamente con el marcador de peso molecular conocido: GENE RULER TM Ikb DNA LADDER.³² Finalmente se midió la movilidad relativa de los plásmidos y del marcador de referencia, aplicando una regla de tres inversa para obtener los pesos moleculares en número de bases de pares, en función del número de pares de bases conocido del marcador (10 000 pb).

Para saber si las cepas aisladas de los peces tenían

Results

We identified 70 bacterial strains from *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis*, and *Vibrio furnissii* species, pertaining to the Aeromonadaceae and Vibrionaceae families. All three were isolated from water, feed, and infected fish kidney samples.

45% of the strains were resistant to six of the 14 tested antibiotics: 100% of them were resistant to cephalothin, 94% to ampicillin, 89% to chloramphenicol, 88% to tetracycline, 85.3% to nitrofurane, 61% to carbenicillin, and 65.3% to kanamycin.

18 of the strains (23%) were sensitive to amikacyn, trimethoprin, cefatoxime, nephilmecin, pefloxacin, and gentamycin. Only one strain, No. 9 from the *A. hydrophila* species, presented resistance to all antibiotics. 20 strains revealed resistance to diverse antibiotics, 67 of the 70 strains revealed resistance to more than one antibiotic (Table 1).

The least percentage of antibiotics (13%) resulted with an intermediate resistance in 23 strains. Strains presented sensitivity to a higher number of antibiotics.

Resistant plasmids were obtained in 94% of the strains. The *Aeromonas hydrophila* strains carried plasmids with molecular weights ranging between 25.7kb-6.6 kb, 30% of these had a molecular weight of 14.2 kp, these strains presented resistance to CF, T, NF, AMP, CB, and K. From *Vibrio fluvialis* strains, plasmids with molecular weights ranging between 15-6.9 kp were obtained, 58% of them carried 11.2 kb plasmids, resistant to CF, AMP, T, NF, CB, and K. The *Vibrio furnissii* strains presented plasmids with molecular weights ranging from 14.2 to 6.6 kp, 33% of them carried 11.2 kp plasmids and were resistant to CF, AMP, T, NF, CB, and K (Table1).

The collection strains presented resistance to CF, AMP, NF, K, and T: *Vibrio parahaemolyticus*, *A. hydrophila*, and *A. caviae* were also resistant to CRO and NF; *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* presented resistance to CTX and NET, all carried a plasmid of 25.7 kb. The *E. coli* strains revealed no resistance to any antibiotic but depicted sensitivity to all of them, and did not carry any plasmid.

No special association could be established between the obtained data and the origin of the samples, i.e., from water, feed, or organisms. No growth was obtained in the dishes seeded with *E. coli* used as a plasmid receptor.

Discussion

The resistance patterns of 70 strains of *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis*, and *Vibrio furnissii* to commercially available antibiotics is shown in Table 1.

In the present study, resulting from the alkaline lysed extracts³¹, and so as to prove the presence of a plasmid using an electrophoresis technique, the resistance and R-plasmid patterns for strains originating from fish kidneys, from water,^{10,11} and from balanced

la capacidad de transmitir el plásmido-R, por conjugación a una bacteria receptora, una cepa de colección (ATCC25922) de *E. coli* fue sembrada en caldo lactosado, se incubó en baño María con movimiento a temperatura de 37°C, durante 24 h. Al mismo tiempo todas las cepas aisladas fueron sembradas en tubos con caldo de LB, se incubaron en la misma forma que *E. coli*, pero a 22°C. Al siguiente día 1 mL de los tubos con el cultivo de *E. coli* se transfirieron a los tubos de las cepas aisladas, nuevamente fueron incubadas de la misma forma, posteriormente tres asadas de cada tubo fueron sembradas en placas de agar de eosina azul de metileno (EMB) preparado con 2.5 mg/L, las placas finalmente se incubaron a 30°C durante 24 h y fueron observadas durante una semana. Se registró el crecimiento o no crecimiento de la bacteria receptora.

Todo el procedimiento se llevó a cabo con cepas de colección: *Aeromonas hydrophila* (ATCC356), *Aeromonas caviae* (ATCC154), *Vibrio alginolyticus* (ATCC177) y *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC178).

Resultados

Se identificaron 70 cepas de bacterias de las especies *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis* y *Vibrio furnissii*, pertenecientes a las familias Aeromonadaceae y Vibrionaceae. Todas fueron aisladas de muestras de agua, alimento y del riñón de peces infectados.

El 45% de las cepas fueron resistentes a seis de los 14 antibióticos probados: 100% de las cepas fueron resistentes a cefalotina, 94% a ampicilina, 89% a cloranfenicol, 88% a tetraciclina, 85.3% a nitrofurantoina, a carbecilina y kanamicina 61.3% y 65.3%, respectivamente.

Presentaron sensibilidad 18 (23%) de las cepas a amikacina, trimetoprim, cefotaxina, netilmecina, pefloxacin y gentamicina. Sólo una cepa, la número 9 de la especie *A. hydrophila*, presentó resistencia a todos los antibióticos, 20 cepas generaron resistencia a siete diferentes antibióticos, 67 de las 70 cepas generaron resistencia a más de un antibiótico (Cuadro 1). El menor porcentaje de los antibióticos (13%) resultaron de resistencia intermedia para 23 cepas. Las cepas presentaron todavía sensibilidad a un buen número de antibióticos.

Se obtuvieron plásmidos resistentes en 94% de las cepas. Las cepas de *A. hydrophila* portaban plásmidos con intervalos de pesos moleculares entre 25.7-6.6 kp, 30% de éstos fueron de 14.2 kp, estas cepas presentaron resistencia a los antibióticos CF, T, NF, AMP, CB, y K; en cepas de *V. fluvialis* se extrajeron plásmidos con intervalos de pesos moleculares de 15-6.9 kp, 58% de esta cepas portaron plásmidos de 11.2 kb con resistencia a los antibióticos CF, AMP, T, NF, CB y K, las cepas de *V. furnissii* presentaron plásmidos de intervalos entre 14.2 kp y 6.6 kp, 33% de ellas portaban plásmidos de 11.2 kp y fueron resistentes a CF, AMP, T, NF, CB y K (Cuadro 1).

Las cepas de colección presentaron resistencia para

feed,^{4,5} were obtained, and no special association was found among them.

Among the scope of antibiotics used in the present study, those most widely accepted by aquaculture farms, and those to which most resistant strains are found are: cephalothin, ampicillin, nitrofurantoin, tetracyclin, chloramphenicol, kanamycin, and carbenicillin. However, the sensitivity of the same bacteria to a greater variety of antibiotics could not be established.

In this study, we obtained plasmids of 6.6 to 25.7 kb for *A. hydrophila*, coinciding with Son *et al.*;¹⁶ however, Chang and Bolton³³ and Chaudhury *et al.*³⁴ report plasmids ranging from 85.6 to 159 kb for strains of the same species. The plasmids obtained from strains of *Vibrio fluvialis* and *Vibrio furnissii* revealed larger molecular weights, ranging between 15 and 6.6 kb, than those reported by Giles *et al.*³⁵ for *V. anguillarum*. This indicates that R factor mediating resistance in *A. hydrophila*, 16 as well as in *V. fluvialis* and *V. furnissii* is of variable size (Table 2).

A larger variety of molecular weights can be asso-

CF, AMP, NF, K y T; *V. parahaemolyticus*, *A. hydrophila* y *A. caviae* resistieron además para CRO y NF; *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* presentaron resistencia para CTX y NET, todas portaron un plásmido de 25.7 kb. La cepa de colección *E. coli* no registró resistencia a ningún antibiótico, pero sí sensibilidad a todos, además de no portar ningún plásmido.

No se estableció ninguna asociación especial de los datos obtenidos con el tipo de procedencia de las muestras: Agua, alimento u organismo. No se obtuvo crecimiento en las cajas sembradas con *E. coli*, como receptoras de plásmidos.

Discusión

Los patrones de resistencia de *A. hydrophila*, *V. fluvialis* y *V. furnissii* a antibióticos de uso comercial, a través de 70 cepas, se muestran en el Cuadro 1.

En este estudio se obtuvieron los perfiles de resistencia y plásmidos-R, tanto de las cepas que procedían de agua y del riñón de los peces,^{10,11} como también del alimento balanceado,^{4,5} sin establecerse ninguna

Cuadro 1

RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE CEPAS BACTERIANAS AISLADAS DE PECES DE ORNATO

Carassius auratus

ANTIBIOTIC RESISTANCE OF BACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM ORNAMENTAL FISH

Carassius auratus.

<i>Antibiotics</i>	<i>Resistant</i>	<i>Susceptible</i>	<i>Intermediate</i>
Cephalothin	75	0	0
Chloramphenicol	26	23	23
Ceftriaxone	24	37	14
Ampicillin	71	3	1
Amikacin	12	60	3
Trimethopim	11	62	3
Ceftaxine	22	38	15
Nephilmecin	18	57	0
Pefloxacin	7	41	27
Carbecillin	46	19	9
Gentamycin	64	7	4
Kanamycin	15	58	3
Nitrofurantoin	49	15	11
Tetracycline	66	4	5

ciated to the plasmids in *A. hydrophila* strains and smaller molecular weights were associated with *V. fluvialis* and *V. furnissii*.

The collection strains used in this study presented only one plasmid with a very high molecular weight, 25.7 kb, which provide resistance to the antibiotics from this study since it is linked with a genetic marker (Table 2) in contrast to that reported by Giles *et al.*³⁵ for *A. salmonicida* (ATCC33658) and *V. ordalii* (ATCC33509) strains that carried several plasmids with low molecular weights.

The resistance to antibiotics in all strains and, in a high percentage of them, reveals the use of chemical control, through antibiotics, without prior knowledge of the specificity of the pathogen that is infecting the culture, the specificity of the antibiotic needed to control the causal agent and/or the dosage needed. This results in a collection of chronically infected fish, who carry bacterial resistance to most commercially available antibiotics, as well as an environment polluted with chemical agents that will induce the formation of resistant bacterial plasmids within the environment, and which can be pathogenic for other species, including humans.

asociación especial con alguna de aquéllas.

Dentro de la gama de antibióticos utilizados en este trabajo, los que han recibido mayor acogida en la acuicultura, al menos en el área que abarcó este estudio, y por el número de cepas que manifestaron resistencia a tales antibióticos son: Cefalotina, ampicilina, nitrofurantoína, tetraciclina, cloranfenicol, kanamicina y carbenicilina. Se desconoce, sin embargo, la sensibilidad de las mismas bacterias a buena variedad de los antibióticos empleados en este estudio.

En el presente trabajo se obtuvieron en *A. hydrophila* plásmidos entre 6.6 a 25.7 kb, coincidiendo con Son *et al.*;¹⁶ sin embargo, Chang y Bolton³³ y Chaudhury *et al.*³⁴ notifican plásmidos de intervalos desde 85.6 a 159 kb para cepas de la misma especie. Los plásmidos obtenidos a partir de cepas de *V. fluvialis* y *V. furnissii*, registraron pesos moleculares mayores, entre 15-6.9 kb, que los notificados por Giles *et al.*³⁵ para *V. anguillarum*. Lo anterior indica que el factor R que media la resistencia tanto en *A. hydrophila*¹⁶ como en *V. fluvialis* y *V. furnissii*, son de talla variable (Cuadro 2).

Se puede relacionar mayor variedad en los pesos moleculares de los plásmidos en las cepas de *A. hydrophila*; asimismo, pesos moleculares menores se

Cuadro 2

PLÁSMIDOS R (kb) EN *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis* Y *Vibrio furnissii* AISLADOS DE PECES DE ORNATO *Carassius auratus*

R-plasmids (kb) in *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis* and *Vibrio furnissii* isolated from the ornamental fish *Carassius auratus*

Strain	Antimicrobial Resistance	Plasmids (kb)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	CF-T-NF-AMP-CB-K	25.7, 22.5, 20, 21.1, 16.3, 15.0,14.2, 11.8, 11.2,6.9, 6.6.
<i>Vibrio fluvialis</i>	CF-AMP-T-NF-K.	15, 13.6, 11.2, 6.9
<i>Vibrio furnissii</i>	CF-AMP-T-NF-CB-K.	15,14.2,13.8, 12.8, 11.8, 11.2,10, 6.9, 6.6.
<i>Aeromonas hydrophila</i> (ATCC35654)	CF-AMP-NF-K-T-CRO	25.7*
<i>Aeromonas caviae</i> (ATCC15468)	CF-AMP-NF-K-T-CRO	25.7*
<i>Vibrio alginolyticus</i> (ATCC17702)	CF-AMP-NF-K-T-CTX-NET	25.7*
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (ATCC17802)	CF-AMP-NF-K-T-CTX-NET	25.7*

* Promega. Life Science Catalog 2001

The presence of more than 1 plasmid indicates the use of more than 1 antibiotic in an attempt to control the infection detected in the fish hatcheries used in this study. On the other hand, the difference in extracted plasmids indicates that different hatches of fish were introduced to the sampled farm, suggesting that the fish introduced were already carrying resistant bacteria that, under different environmental conditions, manifested themselves as pathogenic and again received doses of different antibiotics.

The plasmids obtained in the present study were unable to be transferred to *E. coli*, hence, they do not belong to any incompatibility C or U groups.¹⁵

However, legal restrictions are needed to regulate the use of antibiotics to prevent and control infections in aquaculture, since they will help to reduce the formation and dispersion of R-plasmids in other species that might present such a capacity.

Referencias

1. Pillay T V R. Planning aquaculture. Development and introductory guide Fishing. Oxford: News Book, 1977.
2. Bernabe G. Acuaculture. Barcelona: Omega, 1989
3. Negrete R P, Romero J J. Presencia de bacterias patógenas en peces de ornato. Hidrobiológica 1999;9:85-94.
4. Davis J F, Hayasaka S S. Pathogenesis bacteria associated with cultured American eels. J Fish Biol 1983;23:557-564.
5. Hasting T, McKay A. Resistance of *Aeromonas salmonicida* to ocolinic acid. Aquaculture 1987;61:165-171.
6. Mandigan T M, Martinko M J, Parker J. Biología de los microorganismos. Madrid: Prentice-Hall 2000.
7. Aoki T, Egusa S, Kimura T, Watanabe K. Detection of R factors in naturally occurring *Aeromonas salmonicida* strains. Appl Microbiol 1971;22:716-717.
8. Aoki T, Kitao T, Kawano K. Changes in drugs resistance of *Vibrio anguillarum* in cultures ayu, *Plecoglossus altivelis*. Temminck and Schlegel, in Japan. J Fish Dis 1981;4:223.
9. Aoki T, Kitao T, Iemura Y, Mitoma Y, Nomura T. The susceptibility of *Aeromonas salmonicida* strains isolated in cultures and wild salmonids to various chemotherapeutics. Bull Japanese Soc Sci Fisheries 1983;49:17-22.
10. Watanabe T A, Ogata Y, Egusa S. R factors related to fish culturing. Ann N Y Acad Sci 1971;182: 383-410.
11. Hayasi F, Araki Y, Harada L, Inoe M, Mtsuhashi S. Epidemiological studies of drugs resistance strains in cultured fish and water. Bull Jpn Soc Sci Fisheries 1982;48:1121-1127.
12. Toranzo A E, Barja J L, Colwell R R, Hetrick F L.. Relationship between plasmid strain of *Vibrio anguillarum* isolated from different fish species. Appl Environ Microbiol 1983;55:826-831.
13. Hedges R W, Smith P, Brazil G. Resistance Plasmid of *Aeromonas*. J Gen Microbiol 1985;131:2091-2095.
14. Bast L, Daly F G, De Grandis S A, Stevenson R M W. Evaluation of profiles of *Aeromonas salmonicida* epidemiological markers of furunculosis infection in fish J Fish Dis 1988;11:133-145.
15. Hedges R W, Datta N. R-factors giving chloramphenicol resistance. Nature 1971;234:220-221.
16. Son R, Rusul G, Sahilah A M, Zainuri A, Raha A R, Salmah I. Antibiotic resistance and plasmid profile of *Aeromonas hydrophila* isolates from cultures fish, *Telapia (Telapia mossambica)*. Lett Appl Microbiol 1997;24:479-482.
17. Negrete R P, Romero J J. Estudio cualitativo de las

asociaron con *V. fluvialis* y *V. furnissii*.

Las cepas de colección empleadas en este trabajo presentaron sólo plásmidos con peso molecular de 25.7 kb, a diferencia de los descritos por Giles *et al.*³⁵ para las cepas de *A. salmonicida* (ATCC33658) y *V. ordalii* (ATCC33509), que portaban varios plásmidos de niveles bajos de pesos moleculares

La manifestación de resistencia a antibióticos en todas las cepas y un alto porcentaje de éstas, a siete de los antibióticos probados, indican la aplicación de control químico, por antibióticos, desconociendo por parte de los acuacultores, la especificidad del patógeno que está infectando al cultivo, así como la especificidad del antibiótico necesario para controlar al agente causal y la dosis necesaria. Se intenta fallidamente el uso de un antibiótico tras otro. Al final se obtuvo un lote de peces infectados crónicamente, portadores de bacterias resistentes a la mayoría de los antibióticos más empleados y un ambiente contaminado de químicos que inducirán a la formación de plásmidos resistentes de las bacterias que se encuentren en ese espacio ambiental, y que puedan ser patógenas para otra especies, incluyendo al ser humano.

La presencia de más de un plásmido indica el empleo de varios antibióticos en el intento de controlar la infección detectada en los lotes de peces empleados en este estudio. Por otro lado, es un indicador de que a la granja muestreada ingresaron lotes diferentes de peces, por la diferencia de los plásmidos extraídos, sugiriendo que esos peces ingresaron siendo portadores de bacterias resistentes, y que al variar las condiciones ambientales se manifestaron como patógenas y recibieron nuevamente dosis de diferentes antibióticos.

Los plásmidos obtenidos en este estudio presentaron incapacidad de establecer transferencia a *E. coli*, no perteneciendo, por tanto, a ninguno de los grupos C o U de incompatibilidad.¹⁵

Sin embargo, son necesarias restricciones legales en el uso de antibióticos para prevenir y controlar infecciones en la acuicultura, ya que contribuirían para disminuir la formación y dispersión de plásmidos-R en otras especies que sí presentaran tal capacidad.

- condiciones sanitarias de producción y manejo de granjas acuícolas en los estados de México y Morelos Hidrobiológica 1998;8:43-54.
18. Munro A L S. The pathogenesis of bacterial diseases of fish. In: Roberts R J editor. Microbial diseases of fish. London: Academic Press, 1982:131-149.
 19. Austin B, Austin D A. Bacterial fish pathogen diseases in farmed and wild fish. London: Ellis Horwood Ltd, 1987.
 20. Analytical Profile Index Enterobacteriaceae and other Gram negative bacteria, 4a th. France: Edition BioMerioux. 1977.
 21. Analytical Profile Index. Enterobacteriaceae and other Gram negative bacteria, 4a th. France: Edition BioMerioux. 1989.
 22. Furniss A L, Lee J V, Donovan T S . Group F, a new vibrio? Lancet II, 1977; 1: 565-566.
 23. Lee J V, Shread P, Furniss, A I, Bryant T N. Taxonomy and description of *Vibrio fluvialis* sp. Nov. (Synonym. Group F, Vibrios EF6) J Appl Bacteriol 1981; 50: 73-94.
 24. Brenner D J, Hichman-Brenner W, Lee J V, Steigerwalt A G, Fanning G R, Hollis G G, et al. *Vibrio furnissii* (formely aerogenic biogroup of *Vibrio fluvialis*), a new species isolated from human feces and the environment. J Clin Microbiol 1983; 18: 816-824.
 25. Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, Dtalley J T. Williams T S. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.
 26. Bauer A, Kirby W M M, Sherris J C, Tueck M. Antibiotic susceptibility by a standard single disk method Am J Clin Pathol 1966; 36: 493-496.
 27. Hindler J. Antimicrobial susceptibility testing. In: Isenberg H D editor. Clinical Microbiology. Washington: Procedures Handbook American Society of Microbiology, 1992.
 28. Giono C S. Prueba de Bauer-Kirby para sensibilidad a los antimicrobianos . Infectología III 1983; 7:325.
 29. Stanley RS. Lynch's Medical Laboratory Technology. 2nd Ed. Philadelphia: WB. Saunders, 1983.
 30. Barry A L, Thornsberry C. Susceptibility test. Diffusion test procedures. In: E Lennette editor. Manual of Clinical Microbiology. Washington: American Society for Microbiology 1985:195.
 31. Birnboim H C, Dolly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res 1979;7:1513-1517.
 32. Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, Moore JG, Seidman JG. et al. editors. Short protocols in molecular biology. 4th ed. New York: Wiley & Sons, 1999.
 33. Chang B J, Bolton S M. Plasmid and resistance to antimicrobial agents in *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother 1987;31:1281-1282.
 34. Chaudhury A, Nath G, Shukla B N, Saval S C. Biochemical characterization, enteropathogenicity and antimicrobial resistance plasmid of clinical and environmental *Aeromonas* isolates J Med Microbiol 1966;44:434-437.
 35. Giles J S, Hariharan H, Heaney B S. The plasmid profiles of fish pathogenic isolates of *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii* from the Atlantic and Pacific Coasts of Canada. J Fish Dis 1995;41:209-216.