

Aislamiento e identificación de *Aeromonas bestiarum* a partir de carpa común de cultivo (*Cyprinus carpio* L.) procedentes de Santa María Chapa de Mota, Estado de México, México

Isolation and identification of *Aeromonas bestiarum* in cultured common carp (*Cyprinus carpio* L.) from Santa Maria Chapa de Mota, Estado de Mexico, Mexico

Edgardo Soriano-Vargas* Graciela Castro-Escarpulli** Ma. Guadalupe Aguilera-Arreola**
Fernando Vega-Castillo* Celene Salgado-Miranda*

Abstract

The isolation of *Aeromonas bestiarum* from common carps (*Cyprinus carpio* L.), cultivated at Santa Maria Chapa de Mota, is reported for the first time. The genetic identification for differentiating *A. bestiarum* from *A. salmonicida* is here emphasized.

Key words: *AEROMONAS BESTIARUM*, CARP, AQUACULTURE, MEXICO.

Resumen

Se informa por primera ocasión el aislamiento de *Aeromonas bestiarum* a partir de carpa común (*Cyprinus carpio* L.) de cultivo, procedente de Santa María Chapa de Mota, Estado de México, México. Se enfatiza la identificación genética para la diferenciación entre *A. salmonicida* y *A. bestiarum*.

Palabras clave: *AEROMONAS BESTIARUM*, CARPA, ACUACULTURA, MÉXICO.

Recibido el 3 de septiembre de 2009 y aceptado el 26 de marzo de 2010.

*Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Carretera Panamericana Toluca-Atlaconulco, km 15.5, Toluca, 50200, México, Tel./Fax: (722) 2965555, correo electrónico: soriano@uaemex.mx

**Laboratorio de Bacteriología Médica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Plan de Ayala y Carpio s/n, México, D. F., 11340, Tel. 57296300 ext. 62374.

Introduction

The members of the genus *Aeromonas* are gram-negative rods, inhabitants of a wide variety of environments, although freshwater-associated aquatic fauna and sediments are the most frequent habitats. Infection and disease in several animal species, fish and humans are caused by some *Aeromonas* species.¹

Diagnosis is based on the bacteriological isolation and biochemical identification of the agent. Particularly, salmonid furunculosis is mainly caused by *A. salmonicida*, while *A. bestiarum* has been isolated from diseased fish and its pathogenicity to common carp demonstrated.² *A. salmonicida* strains are non-motile and cause hemolysis. Five subspecies are currently recognized: *A. salmonicida* subspecies *achromogenes*, *A. salmonicida* subspecies *masoucida*, *A. salmonicida* subspecies *pectinolytica*, *A. salmonicida* subspecies *smithia* and *A. salmonicida* subspecies *salmonicida*. Many laboratories classify *A. salmonicida* subspecies *salmonicida* as “typical” and any isolate with phenotypic differences as “atypical”.³ Strains of *A. bestiarum* are usually hemolytic and motile.^{2*} However, an accurate identification between *A. salmonicida* and *A. bestiarum* may be limited by differences in phenotypic characteristics of the isolates.

In Mexico, another mesophilic, motile *Aeromonas* species (i. e., *A. hydrophila*) have been isolated from several cultured fish destined to human consumption and ornamental such as rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*),^{4,5} tilapia (*Oreochromis aureus*; *O. niloticus niloticus*),^{4,6} goldfish (*Carassius auratus auratus*)⁷ and charal (*Chirostoma humboldtianum*).⁸

The isolation of *A. bestiarum* from cultured common carps (*Cyprinus carpio* L.) from Santa Maria Chapa de Mota, Estado de Mexico, Mexico, is reported for the first time in the present work.

As part of the epidemiological surveillance program carried out by the Comité de Sanidad Acuicola del Estado de Mexico, A. C. (CSAEM), cultured common carps sourced from a pond located in Santa Maria Chapa de Mota, were submitted for routine diagnosis. This is a multiage (fingerling, juvenile and adult) farm containing 3 000 fish in semi-intensive ponds. Fish feed on plankton and coexist with wild frogs. The farmer did not report previous pathological conditions.

Twenty, clinical healthy juvenile carps of several weights and lengths (9.47 cm mean length; 11.91 g mean weight) were included in the parasitological, bacteriological, and histological studies.

At external inspection, the following injuries were observed: dorsal and caudal ragged fins (nine and ten fish, respectively); petechial hemorrhages in caudal fin (12 fish); pale gills (two fish); hemorrhages on ventral

Introducción

El género *Aeromonas* incluye microorganismos gramnegativos que residen en amplia variedad de ambientes, aunque su hábitat más frecuente son las aguas dulces en asociación con fauna acuática y sedimentos. Algunas especies de *Aeromonas* infectan y ocasionan enfermedad en diversas especies animales, peces y humanos.¹

El diagnóstico está basado principalmente en el aislamiento bacteriológico e identificación bioquímica del agente. De manera particular, *A. salmonicida* ocasiona furunculosis en los salmónidos principalmente, mientras que *A. bestiarum* se ha aislado de peces enfermos y ha demostrado ser patógena para la carpa común.² Las cepas de *A. salmonicida* no son móviles y producen hemólisis. Actualmente se reconocen cinco subespecies: *A. salmonicida* subespecie *achromogenes*, *A. salmonicida* subespecie *masoucida*, *A. salmonicida* subespecie *pectinolytica*, *A. salmonicida* subespecie *smithia* y *A. salmonicida* subespecie *salmonicida*. Sin embargo, muchos laboratorios clasifican *A. salmonicida* subespecie *salmonicida* como “típica” y cualquier aislamiento con diferencias fenotípicas como “atípica”.³ Las cepas de *A. bestiarum* producen hemólisis y generalmente son móviles.^{2*} Sin embargo, los aislamientos con características fenotípicas diferentes pueden limitar la identificación precisa entre *A. salmonicida* y *A. bestiarum*.

En México se han aislado otras especies de *Aeromonas* del tipo mesofílico y móviles (por ejemplo, *A. hydrophila*) a partir de diversos peces de cultivo destinados para consumo humano y ornato: trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*),^{4,5} tilapia (*Oreochromis aureus*; *O. niloticus niloticus*),^{4,6} pez dorado (*Carassius auratus auratus*)⁷ y charal (*Chirostoma humboldtianum*).⁸

Aquí se informa por primera ocasión el aislamiento de *A. bestiarum* a partir de carpa común (*Cyprinus carpio* L.) de cultivo, procedente de Santa María Chapa de Mota, Estado de México, México.

Como parte del programa de vigilancia epidemiológica del Comité de Sanidad Acuicola del Estado de México, A. C. (CSAEM), se remitieron para diagnóstico carpas de cultivo procedentes de un bordo localizado en Santa María Chapa de Mota. La explotación es de tipo semiintensivo con tres mil peces de diferentes edades (crías, juveniles y adultos). Los peces se alimentan de plancton y conviven con ranas silvestres. El productor no informa condiciones patológicas previas.

Veinte carpas juveniles de talla y peso variado (longitud promedio, 9.47 cm; peso promedio, 11.91 g), clínicamente sanas, fueron incluidas en el estudio parasitológico, bacteriológico e histológico.

*A. Kozinska, comunicación personal, 2009.

and lateral surfaces (two and five fish, respectively). At necropsy, pale hepatopancreas in seven fish was observed.

Splenomegalia (one fish) and congestion (three fish) was also observed. At the parasitological study the following parasites were identified: *Trichodina* spp and *Apiosoma* spp in body mucus; *Trichodina* spp in gill mucus; and *Bothriocephalus acheilognathi* in stomach and intestine (two fish).

For the bacteriological study, gill, intestine, spleen, hepatopancreas and kidney samples were included. *Escherichia coli* from gill samples and *Salmonella* spp from kidney samples were isolated. Based on the biochemical profile, β -hemolysis activity and non-motility of one *Aeromonas* strain isolated from a kidney sample was identified as *A. salmonicida*. In the histological study, no pathological changes in spleen and kidney were observed.

For the genetic identification, the *Aeromonas* isolate was submitted to the Laboratorio de Bacteriología Médica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Genetic identification was performed by 16S rRNA gene restriction fragment length polymorphism (RFLP-PCR) analysis as described by Borrell *et al.*⁹ and Figueras *et al.*¹⁰ A 1502 bp amplified product was purified by using the PureLink PCR Purification Kit* and double digested with Alu-I y Mbo-I enzymes. Products of digestion were vertically electrophoresed on 17% polyacrylamide for obtaining the species common pattern of *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. encheleia*, *Aeromonas* HG11 and *A. popoffi*. A digestion with Nar-I enzyme was performed to obtain the *Aeromonas* species. Two restriction fragments (1 050 bp and 542 bp), a common pattern for *A. bestiarum* and *A. salmonicida*, were obtained. A final digestion with Pst-I enzyme yielded two restriction fragments (1 005 bp and 497 bp), a specific pattern exhibited by *A. bestiarum* (Figure 1). A 1 502 bp product from 16S rRNA amplification was not digested by the restriction endonucleases. A related pattern to *A. salmonicida* and *A. bestiarum* was yielded by *A. piscicola*, a species isolated from salmon and trout. However, *A. piscicola* strains are phenotypically distinguishable due to motility.¹¹

Common carp culture is usually carried out in rustic ponds of standing water, mainly favoring the presence of pathogenic parasites and bacterial agents. *Trichodina* spp and *Apiosoma* spp parasites are frequently identified in fish reared in water pond with abundant suspended organic material. Some authors regard *Trichodina* spp as a commensal parasite. However, both parasites may cause disease in fish.¹² The *Bothriocephalus acheilognathi* cestode is regarded as one of the most successful helminths for parasiting freshwater fish.¹³ Its speed and efficacy for spreading into several hydrological

Durante la inspección externa se observaron: aletas dorsales y caudal deshinchadas (en nueve y diez peces, respectivamente); hemorragias petequiales en aleta caudal (en 12 peces); branquias pálidas (en dos peces); hemorragias en superficie ventral y lateral (en dos y cinco peces, respectivamente). A la necropsia se observó hepatopáncreas pálido (en siete peces).

En bazo se observó esplenomegalia (en un pez) y congestión (en tres peces). En el estudio parasitológico se identificaron: *Trichodina* spp y *Apiosoma* spp a partir de mucus de cuerpo; *Trichodina* spp en mucus de branquias; y *Bothriocephalus acheilognathi* en estómago e intestino (en dos peces).

Para el estudio bacteriológico se incluyeron muestras de branquias, intestino, bazo, hepatopáncreas y riñón. Se aisló *Escherichia coli* a partir de branquias y *Salmonella* spp a partir de riñón. Un aislamiento de *Aeromonas* a partir de riñón fue identificado como *A. salmonicida*, con base en su perfil bioquímico, la actividad β -hemolítica y sin movilidad. En el estudio histológico no se observaron cambios patológicos aparentes en bazo y riñón.

El aislamiento de *Aeromonas* fue remitido al Laboratorio de Bacteriología Médica, de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, para su identificación genética, que se realizó empleando el RFLP-PCR (por sus siglas en inglés: *restriction fragment lenght polymorphism*) del gen 16S ADNr de acuerdo con lo descrito por Borrell *et al.*⁹ y Figueras *et al.*¹⁰ El amplicón de 1502 pb se purificó empleando el sistema comercial PureLink PCR Purification Kit* y se sometió a digestión doble con las enzimas Alu-I y Mbo-I. El producto de la restricción se sometió a electroforesis vertical en poliacrilamida al 17%, para obtener el patrón común de las especies *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. encheleia*, *Aeromonas* HG11 y *A. popoffi*. Para determinar la especie, se realizó una digestión con la enzima Nar-I. Se obtuvieron dos fragmentos de restricción (1 050 pb y 542 pb), un patrón común para *A. bestiarum* y *A. salmonicida*. Una última digestión con la enzima Pst-I produjo dos fragmentos (1005 pb y 497 pb), patrón específico para *A. bestiarum* (Figura 1). El fragmento de 1 502 pb es el amplicón del gen 16S ARNr que no fue digerido por las endonucleasas de restricción. La especie *A. piscicola*, aislada de salmones y truchas, muestra un patrón relacionado con *A. salmonicida* y *A. bestiarum*. Sin embargo, las cepas de *A. piscicola* son distinguibles fenotípicamente debido a que son móviles.¹¹

El cultivo de carpa se realiza generalmente en estanques rústicos con agua estancada, lo cual propicia la presencia de agentes patógenos parasitarios y bacterianos, principalmente. Los parásitos *Trichodina* spp y *Apiosoma* spp son identificados con mayor frecuencia en peces cultivados en agua con abundante

*Invitrogen, Estados Unidos de América.

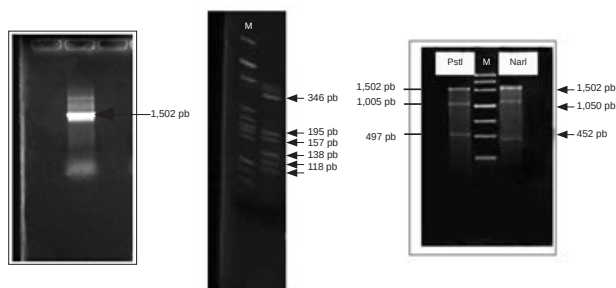


Figura 1. Electroferogramas del amplicón del gen 16S ADNAr de *Aeromonas bestiarum* (a) y patrones de fragmentos obtenidos por la digestión del gen con diversas enzimas de restricción: Alu-I + Mbo-I (b); Pst-I y Nar-I (c).

Figure 1. Electropherograms of *Aeromonas bestiarum* 16S rDNA gene amplicon (a) and patterns of the obtained fragments by gene digestion with several restriction enzymes: Alu-I + Mbo-I (b); Pst-I and Nar-I (c).

basins of the country, since its introduction in 1996, allow a general broad distribution increasing in five-times the number of fish susceptible to infection. In contrast, *B. acheilognathi* appears not to be adapted to South American fish, like in Brazil, where it has been only reported in *Cyprinus carpio*.¹⁴

Bacterial isolations from gills and intestine are common due to exposure to aquatic environment. Bacterial isolation from deeper fish organs implies infection, colonization, and probably the production of damage. The relevance of *Salmonella* spp isolation from kidney samples is unknown. However, these fish mean a risk for infection as they are destined for human consumption. This kind of studies promoted by CSAEM, contribute to the epidemiological surveillance and food safety of the aquatic products cultured in this entity.

No kidney lesions were observed in samples included in the histological study. Although, isolation of *A. bestiarum* from this organ, indicates its capability of infection (establishment in a host) and spreading.¹⁵ The lack of motility, an apparently "atypic" characteristic of *A. bestiarum*, could explain the low virulence of this isolate; therefore, it is necessary to perform pathogenicity studies under controlled conditions.

The process carried out to identify *A. bestiarum* emphasizes the need of genetic identification of isolates. In Mexico, there are a few works where *A. salmonicida* in fish has been genetically identified.¹⁶ The results of this work highlight the importance of the genus *Aeromonas* and the accurate species identification.

In conclusion, this is the first report of *A. bestiarum* isolated from common carps (*Cyprinus carpio* L.), cultivated at Santa Maria Chapa de Mota. Genetic identification of *Aeromonas* performed at diagnostic laboratories for aquatic organisms is necessary.

materia orgánica en suspensión. Algunos autores consideran a *Trichodina* spp un parásito comensal. Sin embargo, ambos parásitos pueden producir enfermedad en los peces.¹² El cestodo *Bothriocephalus acheilognathi* es considerado uno de los helmintos más exitosos para parasitar peces de agua dulce.¹³ La velocidad y la eficacia con que *B. acheilognathi* se ha dispersado en las diferentes cuencas hidrológicas del país, a partir de su introducción en 1996, indican una distribución general muy amplia que ha aumentado en cinco veces el número de peces susceptibles de infección. En contraste, *B. acheilognathi* no parece haberse adaptado a peces sudamericanos, como en Brasil, que sólo se ha registrado en *Cyprinus carpio*.¹⁴

El aislamiento de bacterias a partir de branquias e intestino es común también debido a la exposición al medio acuático. El aislamiento bacteriano a partir de órganos internos implica infección, colonización y posible producción de daño. Se desconoce la relevancia del aislamiento de *Salmonella* spp a partir de muestras de riñón. Sin embargo, debido a que estos peces son destinados para consumo humano, constituyen un riesgo de infección. Este tipo de estudios promovidos por el CSAEM, contribuyen a la vigilancia epidemiológica e inocuidad alimentaria de los productos acuáticos cultivados en la entidad.

No se observaron lesiones en las muestras de riñón incluidas en el estudio histológico; sin embargo, el aislamiento de *A. bestiarum* a partir de este órgano indica la capacidad de infección (establecimiento en un hospedero) e invasión.¹⁵ La falta de movilidad, una característica aparentemente "atípica" en *A. bestiarum*, puede explicar la baja virulencia de este aislamiento, por lo que es necesario realizar estudios de patogenicidad bajo condiciones controladas.

El proceso realizado para la identificación de *A. bestiarum* enfatiza la necesidad de la identificación genética de los aislamientos. Existen pocos trabajos realizados en México en los cuales se haya identificado genéticamente *A. salmonicida* en peces.¹⁶ Los resultados de este trabajo resaltan la importancia del género *Aeromonas* y la correcta identificación de las especies.

En conclusión, el presente trabajo es el primer informe de aislamiento de *A. bestiarum* a partir de carpa (*Cyprinus carpio* L.) de cultivo procedentes de Chapa de Mota. Es necesario realizar la identificación genética de *Aeromonas* en los laboratorios de microbiología diagnóstica de organismos acuáticos.

Agradecimientos

Se agradece al personal del Comité de Sanidad Acuicola del Estado de México, A. C., por las facilidades proporcionadas.

Acknowledgements

Support facilities by the personnel of the Comité de Sanidad Acuicola del Estado de México, A. C., are greatly acknowledged.

Referencias

1. JANDA JM, ABBOTT SL. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. Clin Microbiol Rev 2010; 23: 35-73.
2. KOZINSKA A, FIGUERAS MJ, CHACON MR, SOLER L. Phenotypic characteristics and pathogenicity of *Aeromonas* genomospecies isolated from common carp (*Cyprinus carpio* L.). J Appl Microbiol 2002; 93: 1034-1041.
3. WIKLUND T, DALSGAARD I. Occurrence and significance of atypical *Aeromonas salmonicida* in non-salmonid and salmonid fish species: a review. Dis Aquat Organ 1998; 32: 49-69.
4. CONSTANTINO CASAS F, ARMIJO ORTIZ A, OSORIO SARABIA D, CHAVEZ SORIANO LA. Infección por *Aeromonas hydrophila* e *Ichthyophthirius multifiliis* en trucha (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) y tilapia (*Oreochromis aureus*, L) de un centro de acopio de Morelos, México. Estudio patológico. Vet Méx 1997; 28: 59-62.
5. FUENTES RODRÍGUEZ JM, PÉREZ HERNÁNDEZ JA. Aislamiento de *Aeromona hydrophila* en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). Vet Méx 1998; 29: 117-119.
6. CASTRO-ESCARPULLI G, FIGUERAS MJ, AGUILERA-ARREOLA G, SOLER L, FERNANDEZ-RENDON E, APARICIO GO *et al.* Characterization of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. Int J Food Microbiol 2003; 84: 41-49.
7. NEGRETE REDONDO P, ROMERO JARERO J, ARRENDONDO FIGUEROA JL. Resistencia a antibióticos y presencia de plásmidos en: *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis* y *Vibrio furnissi*, aislados de *Carassius auratus auratus*. Vet Méx 2004; 35: 1-10.
8. PANIAGUA GL, MONROYE, PERCHES M, NEGRETE E, GARCIA O, VACA S. Antibiotic and heavy metal resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from charal (*Chirostoma humboldtianum*, Valenciennes, 1835). Hidrobiológica 2006; 16: 75-80.
9. BORRELL N, ACINASS SG, FIGUERAS M-J, MARTINEZ-MURCIA AJ. Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes. J Clin Microbiol 1997; 35: 1671-1674.
10. FIGUERAS MJ, SOLER L, CHACON MR, GUARRO J, MARTINEZ-MURCIA AJ. Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA RFLP analysis. Int J Syst Evol Microbiol 2000; 50: 2069-2073.
11. BEAZ-HIDALGO R, ALPERI A, FIGUERAS MJ, ROMALDE JL. *Aeromonas piscicola* sp. nov., isolated from diseased fish. Syst Appl Microbiol; 32: 471-479.
12. BASSON I, VAN AS J. *Trichodinidae* and other ciliophorans (Phylum *Ciliophora*). In: WOO PTK, editor. Fish Diseases and Disorders. Vol 1. Protozoan and Metazoan Infections. 2nd ed. London: CABI Publishing, 2006: 154-182.
13. DOVE AD, FLETCHER AS. The distribution of the introduced tapeworm *Bothriocephalus acheilognathi* in Australian freshwater fishes. J Helminthol 2000; 74: 121-127.
14. SALGADO-MALDONADO G, PINEDA-LOPEZ RE. The Asian fish tapeworm *Bothriocephalus acheilognathi*: a potential threat to native freshwater fish species in Mexico. Biological Invasions 2003; 5: 261-268.
15. SORIANO VE, SALGADO-MIRANDA C, SUÁREZ-GÜEMES F, TRIGO TAVERA FJ. Patogenia microbiana: conceptos básicos en la interacción hospedero-microorganismo. Vet Méx 2006; 37: 457-465.
16. SALGADO-MIRANDA C, PALOMARES SME, JURADO CM, MARIN GRA, VEGA CLF, SORIANO-VARGAS E. Isolation and distribution of bacterial pathogens in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from commercial farms in Mexico. Proceedings of the 14th European Association of Fish Pathologists International Conference; 2009 September 14-19; Prague, Czech Republic. Denmark (Frederiksberg): European Association of Fish Pathologists, 2009: 324.