



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS  
Y RECURSOS NATURALES

**“ESTUDIO DE LA PATOGENICIDAD DE DIFERENTES  
ESPECIES DE *Aeromonas* EN LA TRUCHA ARCOÍRIS  
(*Oncorhynchus mykiss*)”.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

**PRESENTA:**

ANDREA PALOMA ZEPEDA VELÁZQUEZ

**COMITÉ DE TUTORES**

Dr. Edgardo Soriano Vargas. Tutor Académico  
Dr. César Ortega Santana. Tutor Adjunto  
Dr. Miguel Rubio Godoy. Tutor Adjunto

El Cerrillo Piedras Blancas. Toluca, Estado de México. Noviembre 2015

**“ESTUDIO DE LA PATOGENICIDAD DE DIFERENTES ESPECIES DE *Aeromonas* EN LA TRUCHA ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*)”.**

El género *Aeromonas* incluye bacterias que habitan naturalmente el medio acuático, capaces de infectar diferentes especies animales, incluido el humano. Las enfermedades causadas por este género ocasionan pérdidas económicas significativas para la industria trutícola. Con el objeto de conocer la patogenicidad y virulencia de diferentes especies de *Aeromonas* spp., en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), en el presente estudio se caracterizaron las lesiones macroscópicas e histológicas presentes en truchas naturalmente infectadas por *A. salmonicida* biovariedad móvil, *A. hydrophila* y *A. veronii*; asimismo se realizó la infección experimental de crías de truchas arcoíris mediante baño de inmersión con una de las 10 especies *Aeromonas* incluidas en el estudio (*A. allosaccharophila*, *A. bestiarum*, *A. caviae*, *A. hydrophila*, *A. lusitana*, *A. media*, *A. popoffii*, *A. salmonicida* biotipo móvil, *A. sobria* y *A. veronii*). Se realizó la eutanasia de 2 peces de cada grupo para obtener aislamientos bacteriológicos y evaluar las lesiones microscópicas durante la hora 1, 2, 3, 4 y 5 post-infección (pi) y se realizó la eutanasia de 5 peces de cada grupo a los días 1, 2, 7 y 14 pi. Los tejidos obtenidos fueron fijados en formalina buferizada al 10% y procesados para su evaluación bajo un microscopio compuesto.

Se obtuvo el aislamiento de *A. veronii* de una trucha infectada naturalmente, en la cual se observó erosión de la dermis y exposición del hueso premaxilar; a la evaluación histopatológica se observó infiltrado de macrófagos y neutrófilos, edema y melanina libre en el área afectada; en hígado se observaron hemorragias multifocales en parénquima, infiltrado de centros melanomacrófagos (CMM), degeneración y necrosis hepatocelular; asimismo, estas lesiones

hepáticas estuvieron presentes en otra trucha infectada con la misma especie de *Aeromonas*, la cual presentó erosión de la aleta dorsal con infiltrado moderado de CMM en la zona afectada. El aislamiento de *A. salmonicida* biovariedad móvil en una trucha en la que se observó una úlcera localizada en la base de la aleta pélvica, se observó infiltración de macrófagos, hiperemia y edema en el área afectada. En hígado, se observó infiltrado de linfocitos y degeneración hepatocelular; además de infiltración de CMM en riñón. Por su parte, el aislamiento de *A. hydrophila* en una trucha en la cual se observó una úlcera localizada en la base de la aleta ventral, histológicamente se mostró infiltración de macrófagos y edema con presencia de formas cocobacilares Gram negativas; en hígado se observó CMM en la periferia de los conductos biliares, infiltración de linfocitos y degeneración hepatocelular. En riñón se observó infiltrado de CMM.

Los peces infectados experimentalmente con los diferentes aislamientos de *Aeromonas*, mostraron los siguientes porcentajes de mortalidad: *A. salmonicida*, 18.8%; *A. hydrophila*, 12.2%; *A. bestiarum*, 8.8%; *A. veronii*, 8.8%; *A. caviae*, 3.3% y *A. sobria*, 1.1 %. Los grupos de peces infectados con *A. allosaccharophila*, *A. lusitana*, *A. popoffii* y *A. media* no registraron mortalidad. Asimismo, se obtuvo el reaislamiento de las 10 especies a partir de branquias; el porcentaje de reaislamiento obtenido de hígado para el grupo infectado con *A. popoffii* fue de 86.6%, *A. media*, 64.4%; *A. sobria*, 45.5%; *A. veronii*, 44.4%; *A. hydrophila*, 41.1%, *A. salmonicida*, 35.5%; *A. allosaccharophila*, 32.2%; *A. bestiarum*, 24.4%; *A. lusitana*, 17.7%, y *A. caviae*, 12.2%; se obtuvo aislamiento de riñón y bazo, sin embargo no se observaron diferencias estadísticas significativas. Únicamente los peces infectados con cuatro especies de *Aeromonas* desarrollaron lesiones macroscópicas. En un pez infectado con *A. salmonicida* se observaron petequias en la superficie ventral cerca del ano y en la zona ventral del opérculo; en un pez infectado con *A. hydrophila* se presentó exoftalmia unilateral con presencia de hemorragia; en un pez infectado con *A. veronii* se

presentó palidez hepática; y en un pez infectado con *A. bestiarum* se presentó congestión hepática severa.

Sin embargo, pese a que no todas las especies de *Aeromonas* indujeron cambios macroscópicos, en todos los grupos infectados, a la histopatología se observó congestión hepática con diferentes niveles de severidad, con los siguientes porcentajes de lesiones microscópicas: *A. allosaccharophila* 83.3%, *A. salmonicida* 68.8%, *A. lusitana* 66.6%, *A. hydrophila* 60.0%, *A. bestiarum* 55.5%, *A. popoffii* 52.2%, *A. sobria* 52.2%, *A. veronii* 45.5%, *A. caviae* 34.4%, las cuales mostraron diferencias estadísticas significativas con respecto a la congestión hepática con el grupo infectado con *A. media* 27.7 % y el grupo control. Los peces del grupo control no mostraron cambios patológicos aparentes, con mortalidad y aislamiento nulo. Estos resultados indican que las especies incluidas en el estudio poseen diferencias en su virulencia y son capaces de diseminarse en tejido interno.

## ABSTRACT

*Aeromonas* includes bacteria that naturally inhabit aquatic environments, which are capable of infecting different animal species including humans. Disease by this agent causes significant economic losses in trout farms. In the present study, we analyzed macroscopic and histologic skin lesions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) naturally-infected by *A. salmonicida* motile biotype, *A. hydrophila* and *A. veronii* isolates. We also assessed the pathogenicity and virulence of ten different, genetically-characterized species of *Aeromonas* isolated from healthy and diseased rainbow trout: *A. allosaccharophila*, *A. bestiarum*, *A. caviae*, *A. hydrophila*, *A. lusitana*, *A. media*, *A. popoffii*, motile biotype *A. salmonicida*, *A. sobria* and *A. veronii*. Rainbow trout fry were experimentally infected by immersion bath; on the day of inoculation, 2 fish from each group were euthanized at 1, 2, 3, 4 and 5 hours post-infection (pi), then on days 1, 2, 7 and 14 pi, 5 fish were euthanized to obtain bacteriological isolates and for microscopic evaluation by histopathology. In both investigations, tissues were fixed in 10% formalin and processed for evaluation and observed with a compound microscope. *A. veronii* was isolated from a trout in which erosion and dermal exposure of premaxillary bone were observed; histopathological evaluation showed the presence of infiltration, edema and free melanin in the affected area. In liver samples, multifocal parenchymal hemorrhage, infiltration of melanomacrophage centers (MMC), hepatocellular degeneration and necrosis were observed; these hepatic lesions were observed in another trout infected with the same *Aeromonas* species, with an eroded dorsal fin showing moderately infiltrated MMC. *A. salmonicida* mobile biovar was isolated from an ulcer located at the base of the right pelvic fin in a trout, in which histopathology showed macrophage infiltration, hyperemia and edema in the affected area. In liver, lymphocyte infiltration and hepatocellular degeneration were observed; MMC further

infiltrated kidney. *A. hydrophila* was isolated from an ulcer located at the base of the ventral fin in trout showing macrophage infiltration, edema and the presence of Gram negative coccobacillary forms in the affected area. In liver, MMC was observed at the periphery of the bile ducts, as well as lymphocyte infiltration and hepatocellular degeneration. In kidney, infiltrated MMC were observed.

Assays with fry experimentally-infected with different isolates of *Aeromonas* showed mortality rates of 18.8% for *A. salmonicida*, *A. hydrophila* 12.2%, *A. bestiarum* 8.8%, *A. veronii* 8.8%, *A. caviae* 3.3% and *A. sobria* 1.1 %, respectively. No mortality was recorded in fry infected with *A. allosaccharophila*, *A. lusitana*, *A. popoffii* and *A. media*. All bacterial isolates inoculated were reisolated from gill. Percentages of bacterial isolation obtained from liver differed between bacterial species: *A. popoffii* 86.6%, *A. media* 64.4%, *A. sobria* 45.5%, *A. veronii* 44.4%, *A. hydrophila* 41.1%, *A. salmonicida* 35.5%, *A. allosaccharophila* 32.2%, *A. bestiarum* 24.4%, *A. lusitana* 17.7% and *A. caviae* 12.2%. Kidney and liver isolations were also obtained, but no statistically significant differences were observed.

Infection with four *Aeromonas* species resulted in gross lesions in trout fry. *A. salmonicida* infection in a fry induced congestion of the ventral surface near the anus and petechial hemorrhages in the ventral part of the opercula; in a fry trout infected with *A. hydrophila*, unilateral exophthalmia and hemorrhage were observed. *A. veronii* infection in a fry induced pale liver, and infection with *A. bestiarum* severe liver congestion. Livers of infected animals showed congestion with different levels of severity: *A. allosaccharophila* 83.3 %, *A. salmonicida* 68.8 %, *A. lusitana* 66.6 %, *A. hydrophila* 60.0 %, *A. bestiarum* 55.5 %, *A. popoffii* 52.2 %, *A. sobria* 52.2 %, *A. veronii* 45.5 % and *A. caviae* 34.4 %; statistically significant differences were observed when contrasting the latter to fry infected with *A. media* 27.7 % and the uninfected control group. The uninfected control group showed no obvious pathological changes, with no mortality and bacterial isolation. These results

indicate that the bacterial species included in the study are different in their virulence and ability to spread in host internal tissues.

## CONTENIDO

---

INTRODUCCIÓN GENERAL	11
----------------------	----

---

I. REVISIÓN DE LITERATURA	12
a. Taxonomía	12
b. Morfología y tinción	13
c. Propiedades bioquímicas	13
II. ECOLOGÍA	14
a. Reservorio y hospederos	14
b. Transmisión	15
c. Signología y patogenia	15
d. Lesiones macroscópicas	17
e. Lesiones microscópicas	18
III. ESPECIES DE <i>Aeromonas</i> DE IMPORTANCIA CLÍNICA PARA LA TRUCHA ARCOÍRIS	20
IV. PRESENCIA DE <i>Aeromonas</i> spp. EN MÉXICO.	24
JUSTIFICACIÓN	26
HIPÓTESIS	27

---



---

OBJETIVO GENERAL	28
a. Objetivos específicos	28
MATERIAL Y MÉTODOS	29
a. Bacterias	29
b. Medio de cultivo	29
c. Preparación del inóculo	30
d. Peces y alojamiento	30
e. Eutanasia de los peces	31
f. Diseño experimental	31
g. Necropsia	32
h. Aislamiento bacteriológico	32
i. Histopatología	33
j. ERIC-PCR	35
k. Análisis estadístico	35
RESULTADOS	36
a. Artículo publicado. Histopathological findings in farmed rainbow trout ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) naturally infected with 3 different <i>Aeromonas</i> species.	38
b. Artículo enviado. Virulence of ten species of <i>Aeromonas</i> in experimentally-infected rainbow trout ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ).	51

---

---

c. Artículo aceptado. <i>Aeromonas</i> spp.: la infección en la trucha arcoíris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) y su aislamiento en México.	67
DISCUSIÓN GENERAL	102
CONCLUSIÓN GENERAL	109
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

---

### ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

---

<b>Cuadro 1.</b> Especies de <i>Aeromonas</i> spp. usadas en la infección experimental.	29
<b>Cuadro 2.</b> Cronograma del diseño experimental.	32
<b>Cuadro 3.</b> Registro de lesiones histológicas en individuos infectados experimentalmente con <i>Aeromonas</i> spp., durante el periodo experimental.	34

---

## INTRODUCCIÓN GENERAL

El género *Aeromonas* spp. está compuesto por bacterias Gram negativas que pertenecen a la familia *Aeromonadaceae* y que forman parte de la microbiota simbiótica de animales acuáticos y terrestres (Merino *et al.*, 1995). Este agente se encuentra ampliamente distribuido en el ambiente acuático y es capaz de producir diferentes tipos de infecciones clínicas tanto en organismos homeotermos y poiquilotermos (Igbínosa *et al.*, 2012), de los cuales los peces son los hospederos principales. Bacterias de este género también han sido aisladas de humanos con diversos cuadros clínicos, como son: infecciones cutáneas, oculares, infecciones respiratorias (Murray *et al.*, 2005), diarreas en niños menores de 5 años (Guevara *et al.*, 2002), en personas con diálisis peritoneal ambulatoria continua (Yang *et al.*, 2008), incluso se han aislado de muestras de pescado congelado y otros alimentos (Yogananth *et al.*, 2009; Palumbo *et al.*, 1989), así como también de agua potable (Tequianes-Bravo *et al.*, 2005), lo que sugiere que esta bacteria es muy versátil y de gran potencial patogénico, que le permite adaptarse a diversos ambientes (Janda, 1991). A lo largo de la historia de este género se han realizado extensos estudios de los cuales se ha obtenido información referente a la signología clínica, lesiones anatomopatológicas y lesiones histopatológicas, así como la obtención de aislamientos de infecciones naturales y el empleo de estos mismos aislamientos para realizar infecciones experimentales, en diferentes especies de peces empleados como modelo de infección (Ping-Chung *et al.*, 2010; Paniagua *et al.*, 1990; Kozińska, 2007).

Debido a la diversidad de patógenos que habitan en ambientes acuáticos, en los que destacan los géneros bacterianos: *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Renibacterium*, *Edwardsiella*, *Lactococcus* y *Streptococcus* (Austin y Austin, 2007); y al crecimiento de la truticultura como fuente de proteína en la cultura mexicana, es necesario investigar y conocer a fondo los patógenos a

los que están expuestas las truchas arcoíris, particularmente el género *Aeromonas* que posee un amplio poder patogénico, ha sido identificado en granjas trutícolas en un 48.78% (Salgado-Miranda *et al.*, 2010) y se ha aislado de truchas clínicamente sanas así como de enfermas (Roberts, 2001), el propósito del presente trabajo fue investigar la patogenicidad y virulencia de diferentes especies de *Aeromonas* obtenidas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

## I. REVISIÓN DE LITERATURA

### a. Taxonomía

El género *Aeromonas* este género pertenece a la familia *Aeromonadaceae*, orden *Aeromonadales* y clase *Gammaproteobacteria* (Castro-Escarpulli *et al.*, 2003). Actualmente el género incluye 30 especies: *A. allosaccharophila*, *A. dhakensis*, *A. aquatica*, *A. australiensis*, *A. bestiarum*, *A. bivalvium*, *A. cavernicola*, *A. caviae*, *A. diversa*, *A. encheleia*, *A. eucrenophila*, *A. filandiensis*, *A. fluvialis*, *A. hydrophila*, *A. jandaei*, *A. lactus*, *A. lusitana*, *A. media*, *A. molluscorum*, *A. piscicola*, *A. popoffii*, *A. rivuli*, *A. salmonicida*, *A. sanarellii*, *A. schubertii*, *A. simiae*, *A. sobria*, *A. taiwanensis*, *A. tecta*, *A. trota* y *A. veronii* (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2013; Martínez-Murcia *et al.*, 2013; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2015). Para su estudio, el género ha sido dividido en dos grandes grupos: el grupo mesófilico, que está conformado por las especies móviles, que pueden causar una signología clínica similar entre ellas, siendo la más frecuente *A. hydrophila*, capaz de causar alta mortalidad y provocar pérdidas económicas significativas en la acuicultura (Noga, 2010); y un grupo psicrófilo, que incluye las especies no móviles: *A. media*, que causa infecciones clínicas en humanos y *A. salmonicida*, la cual infecta en su mayoría a los salmónidos y es el agente causal de la enfermedad conocida como furunculosis (Austin y Austin, 2007).

### **b. Morfología y tinción**

Éste género está conformado por bacterias Gram negativas, anaerobias facultativas, que presentan morfología poco variable (cocobacilar o bacilar pequeña) y miden aproximadamente  $0.3-1.0 \times 1.0-3.5 \mu\text{m}$  (Janda y Abbott, 2010).

### **c. Propiedades bioquímicas**

Las bacterias de género *Aeromonas* son catalasa positiva, productores de gas en glucosa y urea negativos; no obstante, se necesita de un mínimo de 19 pruebas, entre bioquímicas y de susceptibilidad a distintos antimicrobianos para lograr la identificación de la mayoría de las especies (Castro-Escarpulli *et al.*, 2003a). Existen subespecies de *A. salmonicida* que no comparten las características generales del género y han sido catalogadas como atípicas, debido a la poca o lenta presentación del pigmento café observada en el crecimiento de los aislamientos; reacción negativa en la prueba de catalasa, oxidasa negativa, nutricionalmente son fastidiosos y su crecimiento es lento (más de 5 días de incubación) (Austin y Austin, 2007; Buller, 2004). Algunas de las pruebas utilizadas para la identificación general del género se basan: en la sensibilidad al agente vibriostático O/129 (2,4-diamino 6-7 diisopropilpteridina), crecimiento a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl), crecimiento negativo en agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) e inositol negativo (14). La utilización de marcadores moleculares permite la diferenciación genética, tales como: 16S rRNA, gyrB (subunidad B ADN gyrosa), rpoD (factor  $\sigma$ ), rpoB (subunidad  $\beta$ , DNA dependiente de la RNA polimerasa) y la dnaJ (cabeza de proteína shock 40) (Nhung *et al.*, 2007), además de la prueba de polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (por sus siglas en inglés, RFLP) (Borrell *et al.*, 1997).

## II. ECOLOGÍA

### a. Reservorio y hospederos

La distribución del género incluye cuerpos de agua limpia y contaminada, así como sistemas marinos sin extrema salinidad y lodazales, además de formar parte de la flora intestinal de peces sanos (Austin y Austin, 2007). Estos microorganismos cuentan con una amplia variedad de hospederos que incluyen diferentes especies poiquiloterms: tilapia (*Oreochromis* sp) (Vásquez-Piñeros *et al.*, 2010), carpa común (*Cyprinus carpio*) (Kozíńska *et al.*, 2002), bagre (*Ictalurus punctatus*) (Nawaz *et al.*, 2006), anguila común (*Anguilla anguilla*) (Austin *et al.*, 1998), pez dorado (*Carassius auratus*) (Rahman *et al.*, 2001), carpa Koi (*Cyprinus carpio koi*) (Cizek *et al.*, 2010), lenguado (*Scophthalmus maximus*) (Pérez *et al.*, 1996), salmón atlántico (*Salmo salar*) (Holten-Andersen *et al.*, 2012), trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Fuentes y Pérez, 1998), pez roca negro (*Sebastes schlegeli*) (Han *et al.*, 2011), cocodrilo (*Crocodylus niloticus*) (Turutoglu *et al.*, 2005), rana (*Rana tigrina* y *R. rugulosa*) (Pearson *et al.*, 2000); y en el mamífero lobo marino (*Otaria flavescens*) (González *et al.*, 2009); especies terrestres como: cerdo, pollos, perros, gatos y humanos (Paniagua *et al.*, 1990); incluso ha sido aislado de alimentos como pescado congelado (Castro-Escarpillu *et al.*, 2003a), verduras, leche, carne de bovino y embutidos (Janda y Abbott, 2010). La importancia de este microorganismo en la salud pública radica en su poder zoonótico. Asimismo se ha relacionado el desarrollo de la enfermedad con el mal manejo y altas temperaturas registradas en el agua en los periodos de primavera y verano (Amstutz *et al.*, 2000). En humanos producen diarrea (Guevara *et al.*, 2003), infecciones cutáneas (Meik *et al.*, 2011), infecciones oculares (presencia de úlceras en la córnea) (Puri *et al.*, 2003), bacteremia (Chih-Cheng *et al.*, 2007), mortalidad de pacientes inmunocomprometidos (Yang *et al.*, 2008), artritis, entre otras (Isoken *et al.*, 2012).

## **b. Transmisión**

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad pueden variar de aguda a crónica, dependiendo de la edad y la especie de los peces afectados, la cepa bacteriana implicada y las condiciones ambientales (Brown, 2000). Los peces infectados con el grupo de *Aeromonas* móviles, generalmente muestran cuadros subclínicos, clínicos y en ocasiones crónicos (John *et al.*, 2011), mientras que el grupo no móvil, tiende a presentar cuadros subagudos y crónicos en donde se observa la formación de lesiones dérmicas que pueden evolucionar hasta producir la lesión conocida como furúnculo (Noga, 2010). La transmisión horizontal de ambos grupos es causada por la diseminación del agente al ambiente, ya sea a través de las excreciones y la sobrevivencia de la bacteria en el material orgánico, como ocurre en el caso de *A. salmonicida*; o por la formación de úlceras en la piel, siendo éstas el mayor foco de infección durante los brotes. Sin embargo, el aislamiento de bacterias a partir de branquias e intestino es común debido a la exposición al ambiente acuático (Inglis *et al.*, 1993). En un estudio realizado por Rahman y colaboradores (2007), se mostró que la vegetación en plantas tratadoras de agua residuales puede servir como reservorio de *Aeromonas* spp., por lo que el empleo de agua reciclada para la acuicultura posee un alto grado de riesgo para las especies acuáticas así como para la salud pública.

## **c. Signología y patogenia**

Cabe destacar que la descripción de la signología y patogenia para el grupo de las *Aeromonas* móviles es similar entre las especies móviles y en la mayoría de los casos *A. hydrophila* es la especie más reportada (Noga, 2010). Por ello, la infección causada por este grupo es conocida de manera general como “septicemia por *Aeromonas* móviles (SAM)” (Roberts, 2001), la signología no es específica y los peces infectados muestran una morbilidad del 80% y mortalidades

acumuladas aproximadas de 50% (Fuentes y Pérez, 1998). La SAM se caracteriza por producir lesiones en la dermis, en donde se presentan diferencias en: características morfológicas (úlceras y/o hemorragias), localización (focal y/o multifocal), zonas infectadas (craneal, caudal, dorsal, ventral y/o lateral) y la presencia lesiones en aletas (dorsales, caudales, ventral, pectorales y/o anal) (Noga, 2010). Las hemorragias producidas por las hemolisinas pueden volverse procesos septicémicos, los hallazgos macroscópicos identificados en los peces incluyen: exoftalmia, ulceración ocular e hidropesía (Cipriano, 2001), hiperpigmentación de la dermis, protrusión rectal, presencia de petequias, necrosis en la base de las aletas y/o putrefacción en las aletas, que puede desarrollarse sin la necesidad de lesiones en la piel (Nam *et al.*, 2007; Saavedra *et al.*, 2004).

En el caso de *A. salmonicida* puede sobrevivir afuera del hospedero, dependiendo de las condiciones presentes en el agua (Hiney *et al.*, 1997). Todas las edades son susceptibles a presentar la enfermedad, aunque los peces jóvenes son infectados en menor frecuencia pero cuando esto ocurre saltan fuera del estanque, la dermis puede presentar hiperpigmentación y los peces mueren (Roberts, 2001). Sin embargo, peces enfermos pueden llegar a recuperarse, incluso cuando la lesión se localiza en músculo esquelético sin llegar a la cavidad celómica (Hiney *et al.*, 1997). Los signos clínicos de la enfermedad dependen del tiempo y curso de la infección; los casos hiperagudos se presentan generalmente en crías de salmónidos con muerte súbita (Noga, 2010). En peces de mayor edad la presentación subaguda y crónica tiende a desarrollar el furúnculo; en la presentación aguda se manifiesta con una septicemia hemorrágica que puede generarse sin la presentación de lesiones furunculosas en la piel. En casos donde el furúnculo logra desarrollarse, la ulceración y erosión de éste origina la secreción de fluido sanguinolento en el agua, lo que permite la diseminación del agente (Inglis *et al.*, 1993).



En los casos crónicos el progreso de la infección es lento y resulta en una localización generalizada del agente en las vísceras, infectando diferentes tejidos, como son: branquias, hígado bazo, riñón, células epiteliales de los vasos sanguíneos e intestino (Inglis *et al.*, 1993). También es común la presentación de letargia, inapetencia, petequias y en algunas ocasiones se observa hinchazón en la base de las aletas, si el proceso infeccioso persiste puede transformarse en una úlcera; adicionalmente, se ha observado exoftalmia y secreción sanguinolenta en narinas (Noga, 2010).

#### **d. Lesiones macroscópicas**

Para el caso de las *Aeromonas* móviles, a la necropsia se ha observado branquias hemorrágicas y congestión en órganos internos; de manera similar el riñón puede presentar hemorragias (Fuentes de Pérez, 1998); el bazo y el riñón pueden encontrarse tumefactos, originando la salida de líquido; además se han observado petequias en órganos internos e hinchazón del intestino (Inglis *et al.*, 1993). En la infección experimental con *A. hydrophila* subespecie *dhakensis* (actualmente *A. dhakensis*) inoculada por vía intramuscular (IM) en trucha arcoíris, se observó septicemia hemorrágica generalizada con presencia de lesiones tipo furunculosis alrededor del sitio de inyección, así como lesiones hemorrágicas en cabeza, ojos y branquias (Kozinińska, 2007).

En peces infectados con *A. salmonicida* se ha observado la presencia de hemorragias en la base de las aletas y en las branquias, además de la presencia de úlceras (Kinkelin, 1991). La presentación crónica de la enfermedad se observa generalmente en peces de mayor edad, en donde la presencia de lesiones furunculosis se hace evidente, dependiendo de la virulencia de la bacteria la lesión puede extenderse hasta cavidad celómica, provocando una infección sistémica y la muerte del pez (Noga, 2010). En intestino se han observado lesiones hemorrágicas y necróticas, los

animales por lo general dejan de comer y el contenido del intestino está constituido por moco y sangre (Mulder *et al.*, 2007). En corazón, se ha observado infiltración de fluido en pericardio, además de una coloración rojo cereza del bazo y color gris en hígado (Inglis *et al.*, 1993).

#### **e. Lesiones histológicas**

La histopatología de peces con SAM ocasiona depleción hematopoyética, necrosis de células renales y esplénicas, necrosis en el lumen y en la membrana mucosa del intestino, además de observarse necrosis focal en tejido cardíaco, hígado, gónadas y páncreas; en encéfalo se ha observado congestión leptomeníngea (Cipriano, 2001); en hígado se ha observado hepatitis multifocal no supurativa y colangiohepatitis (Saavedra *et al.*, 2004). En la dermis se ha observado edema severo, hiperemia del estrato reticular, ulceración y necrosis hemorrágica, que puede extenderse hasta músculo esquelético en casos severos (Rey *et al.*, 2009). En piel y músculo se ha observado dermatitis y miositis aguda-crónica, con presencia de infiltrado conformado principalmente por neutrófilos (Saavedra *et al.*, 2004). En ojos se ha observado trombosis e inflamación en la región periesclerótica así como en el epitelio corneal. Cuando un pez se recupera de la SAM, la presencia de úlceras en la dermis es seguida de la regeneración del tejido y la eliminación del patógeno (Fuentes y Pérez, 1998).

Se ha observado que aislamientos obtenidos de truchas arcoíris clínicamente sanas, de diferentes especies de *Aeromonas* (*A. bestiarum* y *A. veronii*) usadas para infectar experimentalmente truchas sanas, son capaces de provocar mortalidad y signología, manifestadas en diferentes niveles de virulencia en donde las lesiones se manifestaron por úlceras y necrosis en casos crónicos y subagudos, distensión abdominal, anemia y hemorragias en tejidos internos (Kozínska, 2007). Otras diferentes rutas de infección experimental incluyen la inoculación

intraperitoneal (IP) con aislamientos de *A. hydrophila* obtenidos de sedimentos de agua de río, las cuales provocaron lesiones hemorrágicas en la pared de la cavidad celómica, palidez en hígado y ascitis (Paniagua *et al.*, 1990). De manera similar, un estudio realizado por Nya y Austin (2010) en donde se inyectaron por vía IP lipopolisacáridos (LPS) obtenidos de un aislamiento de *A. hydrophila* de un barramundi (*Lates calcarifer*) para infectar experimentalmente a truchas arcoíris, no provocaron signología durante el periodo de infección; sin embargo, se presentó una mortalidad del 45%, observada en la mitad del periodo experimental y un incremento en las células inmunológicas de los peces infectados.

Los hallazgos histopatológicos en la epidermis de peces infectados con *A. salmonicida* incluyen la presencia agregados basófilos (colonias bacterianas) localizados de manera focal o multifocal, con o sin presencia de células inflamatorias como son los macrófagos, así como la presencia de focos de necrosis licuefactiva al centro de las lesiones, presente de manera similar en tejido conectivo del riñón (Inglis *et al.*, 1993).

En la superficie del intestino se observan petequias y en tejido cardíaco se ha observado necrosis cardíaca tóxica especialmente en los atrios, así como la localización focal de agregados basófilos y una marcada depleción linfocitaria en riñón y bazo; además de observarse la desgranulación de eosinófilos en la mucosa del intestino, que puede extenderse y presentarse en menor grado en las branquias (Hiney *et al.*, 1997, Powell *et al.*, 1991). Un estudio realizado por Jutfelt y colaboradores (2006) demostró que *A. salmonicida* emplea la translocación desde el epitelio intestinal a diversos órganos, siendo esta una ruta de infección eficiente en hospederos inmunodeprimidos.

Los peces que logran recuperarse de la enfermedad pueden fungir como reservorios, eliminando el agente etiológico al medio acuático y predisponer a la población susceptible a un

nuevo brote (John *et al.*, 2011; Allejo y Ellis, 1989). La tasa de morbilidad en peces estresados representa el 90% (Dror *et al.*, 2006), mientras que la mortalidad en peces infectados con *A. salmonicida* oscila entre el 80 y 90%, siendo este agente patógeno uno de los primeros sospechosos que provocan pérdidas económicas en granjas de peces (Kirkan *et al.*, 2003; Kozińska *et al.*, 2002).

### **III. Especies de *Aeromonas* de importancia clínica para la trucha arcoíris**

#### *Aeromonas hydrophila*

Este agente ha sido considerado patógeno secundario asociado con brotes de enfermedad, sin embargo existe abundante evidencia que indica que las lesiones causadas por esta bacteria son tan significativas que pudieran posicionarlo como un agente patógeno primario, ya que se sabe que es capaz de causar brotes en granjas con altos porcentajes de mortalidad que provocan pérdidas económicas significativas en la industria acuícola alrededor del mundo (Pridgeon *et al.*, 2011).

Es una bacteria móvil, que se encuentra ampliamente distribuida en ambientes acuáticos (Austin y Austin, 2007), es responsable de causar infecciones clínicas a una gran variedad de peces de agua dulce y en ocasiones también a peces marinos, además infectar al humano (Paniagua *et al.*, 1990). La morfología de sus colonias es de tipo convexas, blanquecinas y circulares, crece a temperaturas que van desde los 22- 24 e incluso hasta 37° C, en un periodo de 24- 48 horas en medios enriquecidos como el agar tripticasa soya (TSA por sus siglas en inglés, *trypticase soy agar*) y agar sangre adicionado con 10% de sangre de ovino (John *et al.*, 2011; Janda y Abbott 2010; Aguilera-Arreola *et al.*, 2009).

Este microorganismo está asociado al desarrollo SAM e infecta a peces que se han sido sometido a estrés de cualquier naturaleza (Kozińska *et al.*, 2002). La presentación aguda de la

enfermedad se relaciona con el manejo y las altas temperaturas registradas en el agua en los periodos de primavera y verano, provocando una alta mortalidad (Inglis *et al.*, 1993). Los peces infectados tienden a mostrar hiperpigmentación, con o sin presencia de hemorragias que presentan variación en la extensión de la superficie afectada, puede haber la presencia de ascitis, además de la de úlceras y zonas necróticas en el tejido lesionado (Austin y Austin, 2007). A la necropsia los tejidos internos se ven congestionados y/o presentar hemorragias; el bazo y el riñón se encuentran tumefactos, lo que origina la salida de líquido semifluido, dando la apariencia de que el tejido gotea, de ahí se derivó su antiguo nombre *Aeromonas liquefaciens* (Roberts, 2001). Al estudio histopatológico del tejido interno se observa: depleción hematopoyética, necrosis de las células renales y esplénicas, necrosis en el lumen y la membrana mucosa del intestino, además de observarse necrosis en tejido cardíaco, hígado, gónadas y páncreas. En la dermis se ha observado edema en grado severo, hiperemia del estrato reticular, ulceración y necrosis hemorrágica (Lund *et al.*, 2009; Rey *et al.*, 2009; Roberts, 2001; Janda, 1991).

### *Aeromonas bestiarum*

Es uno de los agentes causales de septicemia en peces, considerado importante en las *Aeromonas* móviles (Kozíńska y Guz, 2004), la signología clínicas en los peces infectados puede manifestarse como úlceras oftálmicas, afecciones de la piel, incluyendo septicemia hemorrágica (Turska-Szewczuk *et al.*, 2011). En un aislamiento de esta especie obtenido de una muestra de agua de río, se identificó la presencia de un plásmido multirresistente denominado pAB5S9 (Gordon *et al.*, 2008). Asimismo, un estudio realizado por Kozíńska y colaboradores (2002) mostraron que 13 aislamientos de *A. bestiarum* obtenidos de carpa común y 3 de truchas arcoíris inmunodeprimidas, pueden causar que el patógeno se torne severamente virulento y se desarrollen úlceras y necrosis en

la piel. Además se ha reportado que puede ser aislada de riñón sin cambios patológicos aparentes, lo que sugiere que posee la capacidad de infección e invasión (Soriano-Vargas *et al.*, 2010).

#### *Aeromonas sobria*

Anteriormente era conocida como *Aeromonas popoffii* y *A. veronii*, pertenece al grupo de las *Aeromonas* móviles. Su morfología es bacilar con polos redondeados. Generalmente habita estanques lodosos y zonas acuáticas con temperaturas elevadas (Austin y Austin, 2007). El aislamiento de esta bacteria en casos de septicemia hemorrágica es poco frecuente en comparación con *A. hydrophila*; la diferencia entre ambas especies en la presentación clínica no es clara (Janda y Abbott, 2010). Un estudio realizado por Ya y Shuang-Hu (2001), reportaron que un aislamiento de *A. sobria* identificado como PY36, puede infectar a tilapias jóvenes provocando signos clínicos, como son: putrefacción de la cola, ascitis con o sin distensión abdominal y anorexia. Algunos cambios patológicos incluyen hiperpigmentación de la dermis y la presencia de erosión en aletas caudales y hemorragias en hígado, asimismo ha sido reportada como una bacteria no patógena (Lallier *et al.*, 1981).

#### *Aeromonas piscicola*

Su nombre proviene de –piscis- que significa pez y de –cola- que significa morador o habitante, por lo que la traducción de su nombre sería “bacteria que habita en el pez”. Posee un flagelo polar, las colonias bacterianas miden 1.5-2.0  $\mu\text{m}$  de largo y 0.6-1.0  $\mu\text{m}$  de ancho, no es productora de pigmento marrón. El aislamiento de esta bacteria fue obtenido de un pez moribundo (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2009).

### *Aeromonas salmonicida*

Fue aislada por primera vez en Alemania en 1894 y era conocida como *Bacillus forellenseuche* o bacilo de la enfermedad contagiosa de la trucha (Belland y Trust, 1988); actualmente la enfermedad es conocida como furunculosis (Noga, 2010). Esta bacteria se diferencia de las demás especies por ser no móvil; sin embargo se ha identificado un biotipo móvil (Kozíńska 2007 *et al.*, 2007; Vega-Sánchez *et al.*, 2014a). Posee una forma coco bacilar y en la mayoría de los casos produce un pigmento café en agar tripticasa de soya (Austin y Austin, 2007). Sin embargo dentro de este grupo existen *Aeromonas* que no comparten estas características y han sido catalogadas como atípicas debido a la poca, leve o lenta presentación del pigmento café de los aislamientos, reacción negativa a la prueba de catalasa, oxidasa negativa, nutricionalmente son fastidiosos y presentan lento crecimiento (más de 5 días de incubación) (Buller, 2004).

*A. salmonicida* es considerado como patógeno primario, se ha aislado de una amplia variedad de salmónidos y no salmónidos que presentan infecciones clínicas, así como de peces clínicamente sanos (Roberts, 2001; Wiklund y Dalsgaard, 1998). Este patógeno puede sobrevivir fuera del hospedero, dependiendo de las condiciones que se presenten en el agua, tales como: salinidad, pH, temperatura y contaminación (Hiney *et al.*, 1997). Algunos factores predisponentes para que los peces de agua dulce o marinos, en su medio natural o en granjas tengan una presentación clínica de la enfermedad son: manejo inadecuado, pobre calidad y dureza del agua, altas temperaturas de los estanques, trauma o lesiones en la piel de los peces, la patogenicidad y virulencia del agente infeccioso (Roberts, 2001; Inglis *et al.*, 1993).

#### IV. PRESENCIA DE *Aeromonas* spp. EN MÉXICO.

Los estudios que se han realizado en México informan el aislamiento de diferentes especies de *Aeromonas*. Tal es el caso de *A. hydrophila* aislado de charales (*Chirostoma humboldtianum*, Valenciennes, 1835) para consumo humano (Paniagua *et al.*, 2006); otras especies como *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. veronii* biovariedad *veronii* y *A. encheleia* han sido aisladas de tilapias (*Oreochromis niloticus*) congeladas en un mercado de la ciudad de México (Castro-Escarpulli *et al.*, 2003); asimismo un brote *A. hydrophila* en una granja trutícola en el estado de México, en el que se observó septicemia hemorrágica con morbilidad de 80% y mortalidad de 51.2%, (Fuentes y Pérez, 1998). Un estudio patológico en trucha arcoíris (*O. mykiss*) y en una tilapia (*Oreochromis aureus*, L.) que presentaban cogestión marcada y la infestación con *Ichthyophthirius multifiliis* en branquias, se reportó el aislamiento de *A. hydrophila* de branquias, hígado, riñón y bazo (Constantino *et al.*, 1997); y el aislamiento de *A. bestiarum* a partir de carpa común (*Cyprinus carpio* L.) (Soriano-Vargas *et al.*, 2010).

En un estudio realizado por Salgado-Miranda y colaboradores (2010), identificaron aislamientos de *Aeromonas* obtenidas a partir de trucha arcoíris de cultivo, provenientes de diversas granjas de México, que fueron identificados como *A. hydrophila*, *A. salmonicida* y *Aeromonas* spp., en donde el 48.78 % de los aislamientos obtenidos pertenecieron al género *Aeromonas*. Recientemente se identificaron 10 especies de *Aeromonas* aisladas de trucha arcoíris (*O. mykiss*) provenientes de diferentes granjas de México, siendo *A. veronii* biovar *sobria*, *A. hydrophila* y *A. bestiarum* las especies más predominantes (Vega-Sánchez *et al.*, 2014a).

La producción de trucha arcoíris en México es una actividad de gran importancia debido a su alta demanda como fuente de proteínas, datos publicados en el mes de mayo del 2015 en un



comunicado de prensa; reportan que la producción nacional pesquera y acuícola del 2014 ascendió a un millón 751 mil 952 toneladas, obteniéndose un 32.2 % de incremento del año 2013 al año 2014; siendo la mojarra, trucha y el ostión las principales especies en producción (SAGARPA, 2015). A finales del 2014 la producción de trucha arcoíris genero 527,247.11 kilos de peso vivo, con un equivalente de 28, 582, 065.83 pesos en el estado de México (CONAPESCA, 2015). La producción de ésta especie se localiza principalmente en los estados de México, Puebla, Michoacán, Hidalgo, Chihuahua y Veracruz (SAGARPA, 2011); por lo que la presencia de este género en la truticultura debe ser considerada como una amenaza.

## JUSTIFICACIÓN

Existen especies de *Aeromonas* que particularmente se asocian a enfermedad en humanos. Asimismo, ciertas especies de *Aeromonas* se asocian a enfermedad y otras han sido aisladas de peces asintomáticos. Diferentes especies particularmente se consideran ambientales, ya que han sido aisladas del medio acuático o vegetal. Recientemente, se tiene conocimiento de las especies de *Aeromonas* que infectan a la trucha arcoíris de cultivo en México. Sin embargo, se desconoce la patogenicidad de estas diferentes especies de *Aeromonas* aisladas de truchas arcoíris, y por tanto, surge la necesidad determinar la patogenicidad y virulencia de las especies de *Aeromonas* que infectan a la trucha arcoíris.

## **HIPÓTESIS**

Las especies de *Aeromonas* spp. que se han asociadas a procesos patológicos en la trucha arcoíris son patogénicas y de mayor virulencia que las especies aisladas de peces clínicamente sanos o condiciones ambientales.

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la patogenicidad y virulencia de diferentes especies del género *Aeromonas* obtenidos de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en México.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Describir las lesiones histológicas de truchas arcoíris infectadas naturalmente con *Aeromonas* spp.
- Determinar la patogenicidad y virulencia de las especies de *Aeromonas* que infectan a la trucha arcoíris.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Bacterias.** Se emplearon 10 aislamientos diferentes de *Aeromonas* spp., previamente identificadas (Vega-Sánchez *et al.*, 2014a) y obtenidas de truchas arcoíris (**Cuadro 1**).

**Cuadro 1.** Especies de *Aeromonas* spp. usadas en la infección experimental.

Aislamiento	Origen	Tipo de Agua	Estado de la republica
<i>A. allosaccharophila</i> (ESV- 385)	Branquias	Río	Hidalgo
<i>A. bestiarum</i> (ESV- 365)	Lesión	Río	Edo. México
<i>A. caviae</i> (ESV- 378)	Branquias	Ojo de agua	Veracruz
<i>A. hydrophila</i> (ESV- 394)	Lesión	Manantial	Michoacán
<i>A. lusitana</i> (ESV- 351)	Branquias	Arroyo	Hidalgo
<i>A. media</i> (ESV- 398)	Bazo	Río	Hidalgo
<i>A. popoffii</i> (ESV- 354)	Riñón	Arroyo	Hidalgo
<i>A. salmonicida</i> (ESV- 396)	Lesión	Manantial	Hidalgo
<i>A. sobria</i> (ESV- 369)	Riñón	Río	Hidalgo
<i>A. veronii</i> (ESV- 393)	Lesión	Manantial	Edo. México

**Medios de cultivo.** Para el mantenimiento, propagación y aislamiento de los microorganismos se utilizó agar tripticasa soya (TSA por sus siglas en inglés, *trypticase soy agar*), caldo tripticasa soya (TSB por sus siglas en inglés, *trypticase soy broth*) y agar selectivo para *Aeromonas* y *Pseudomonas* según Kilelwein (GSP) adicionado con penicilina G procaínica inyectable de uso veterinario; los aislamientos de *Aeromonas* en el medio GPS viran al color

amarillo. Todas las placas fueron incubadas de 24 a 48 hrs a una temperatura de  $24 \pm 2$  °C (Vivas *et al.*, 2005).

**Preparación del inóculo.** Cada aislamiento fue sembrado en placas de TSA e incubadas a  $24 \pm 2$  °C durante 24 horas. Las colonias fueron cosechadas por medio de un asa bacteriológica y fueron colocadas en 300 ml (mililitros) de TSB e incubadas a  $24 \pm 2$  °C durante toda la noche, el medio TSB fue centrifugado a 10,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 20 min. Se decantó el sobrenadante y se agregó 50 ml de TSB estéril para despegar las bacterias del fondo del tubo y colocó el inóculo bacteriano en un matraz con 250 ml de TSB estéril. La concentración del inóculo bacteriano fue determinada por densidad óptica (DO) a 540 nanómetros (nm) y ajustando en el espectrofotómetro a una DO= 1. Para determinar la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) se prepararon 8 viales con capacidad de 1.7 ml y se les colocó 900 µl (microlitros) de TSB cada uno, a cada vial se le agregó 100 µl del inóculo en el primer vial, se realizaron diluciones decuples seriadas, posteriormente se colocaron 3 gotas de 10 µl de cada dilución, las placas de TSA se incubaron a  $24 \pm 2$  °C durante 24 horas, la concentración del inóculo bacteriano fue de  $1.0 \times 10^8$  UFC /ml. Se realizaron 3 réplicas para cada aislamiento, todos los aislamientos fueron trabajados por separado (Pridgeon *et al.*, 2011).

**Peces y alojamiento.** Se emplearon un total de 990 crías de trucha arcoíris (*O. mykiss*) de aproximadamente 3 a 5 centímetros (cm) de longitud clínicamente sanos y sin historial de vacunación. Los animales fueron aclimatados durante 2 semanas en contenedores de polipropileno de 100 litros (l) para 100 crías, en agua desclorada, con oxigenación y cambios diarios de agua de 50 l empleando un sifón para agua, con un pH de  $7.0 \pm 0.2$  (Lapatra *et al.*, 2010). A los peces se les

proporcionó alimento comercial de acuerdo a su edad y sin antibióticos. La cantidad de alimento fue calculada al 4% de su peso. Los animales fueron expuestos a fotoperiodo natural (13 horas luz y 11 horas oscuridad) durante el transcurso del experimento (Winandy y Denoël, 2013).

**Eutanasia de los peces.** A todos los peces se realizó la eutanasia con una sobre dosis de MS- 222 (metasulfonato de triclaína) (Sigma, USA) buferado a un pH de  $7.0 \pm 0.2$ , posteriormente se procedió a cortar el cordón espinal (Noga 2010).

**Diseño experimental.** Posteriormente a las 2 semanas de adaptación, se colocaron aleatoriamente 120 crías (3 réplicas y un grupo control) en 4 peceras de 6 l. Se agregaron 2.7 l de agua potable desclorada y se añadió 300 ml del inóculo bacteriano para completar 3 l. Los animales permanecieron durante 1 hora (h) y 30 minutos (') en baño de inmersión. En el grupo control se le colocaron 300 ml de TSB estéril durante el mismo tiempo. Posteriormente los animales fueron colocados en acuarios nuevos con 6 l de agua acondicionada (acondicionador comercial Neutra-Stress, dosificado conforme a las instrucciones del producto). Se realizaron cambios diarios de agua del 60% para eliminar residuos orgánicos y alimento no consumido. En el **Cuadro 3** se observa el cronograma de trabajo, posteriormente a la inoculación se eutanasiaron 2 peces de cada grupo durante las siguientes 5 horas (10 peces total por grupo de trabajo), asimismo se eutansio 5 peces los días 1, 2, 7 y 14 (20 peces) para obtener reaislamiento y hallazgos microscópicos. Las mortalidades fueron registradas, así como la presencia de lesiones macroscópicas (Pridgeon *et al.*, 2011). Todos los grupos fueron trabajados por separado.

**Cuadro 2.** Cronograma del diseño experimental.

Tiempo Acción	Semana		Día 0 Horas post infección (hpi)						Días experimentales Días post infección (dpi)						
	1	2	0	1	2	3	4	5	1	2	3	4-6	7	8-13	14
<b>Adaptación</b>	X	X													
<b>Inoculación</b>			X												
<b>Observación / registro</b>				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<b>Necropsia</b>				X	X	X	X	X	X	X			X		X

**Necropsia.** Inmediatamente después de realizar la eutanasia, se realizó la necropsia, toma de muestras para bacteriología y el registro de lesiones macroscópicas (Noga, 2010).

**Aislamiento bacteriológico.** Se tomaron muestras a partir de branquias, bazo, hígado, riñón e intestino; éstas fueron tomadas asépticamente con ayuda de un mechero Bunsen y un asa bacteriológica, fueron sembradas en placas de agar GSP e incubadas durante toda la noche a  $24 \pm 2$  °C. Se seleccionaron 90 colonias por grupo, como máximo para ser congeladas e identificadas posteriormente por pruebas moleculares (Castro-Escarpulli *et al.*, 2003).

**Histopatología.** Los tejidos fueron colocados en formaldehído al 10% amortiguado a un pH de 7.2, durante 24 hrs para su fijación. Posteriormente, éstos fueron cortados, deshidratados e



incluidos en parafina. Se realizaron cortes de 3 a 5  $\mu\text{m}$  con ayuda de un micrótomo; éstos se montaron sobre un portaobjetos, para teñirse con la tinción de hematoxilina y eosina (HE). Cada sección fue examinada y fotografiada con un microscopio compuesto Nikon Eclipse 80i. Las lesiones histológicas fueron descritas y clasificadas con base a la siguiente escala: 0= sin cambios patológicos, 1= cambios patológicos leves, 2= cambios patológicos moderados y 3= cambios patológicos severos (Zepeda *et al.*, 2010) (**Cuadro 3**).

**Cuadro 3.** Registro de lesiones histológicas en individuos infectados experimentalmente con *Aeromonas* spp., durante el periodo experimental.

	1 hpi	2 hpi	3 hpi	4 hpi	5 hpi	1 dpi	2 dpi	7 dpi	14 dpi
<b>Branquias</b>									
Congestión/ hiperemia									
Edema									
Telangiectasia									
Fusión de laminillas									
Hiperplasia de células epiteliales									
Degranulación de eosinófilos									
Infiltrado de macrófagos									
infiltrado de neutrófilos									
Infiltrado de linfocitos									
Agregados basófilos									
<b>Hígado</b>									
Hiperemia/ congestión									
Edema									
Infiltrado de neutrófilos en intersticio									
Infiltrado de neutrófilos perivascular									
Infiltrado linfocitario en intersticio									
Infiltrado linfocitario perivascular									
Degeneración hepatocelular									
Necrosis de hepatocitos									
Agregados basófilos									
<b>Riñón</b>									
Hiperemia /congestión									
Edema									
Necrosis de células en tubulos renales									
Depleción de tejido hematopoyético									
Infiltrado de melanomacrófagos en parénquima									
Agregados basófilos									
<b>Bazo</b>									
Hiperemia / congestión									
Edema									
<b>Intestino</b>									
Hiperemia / congestión									
Edema									
Hiperplasia de las células goblet									
Erosión apical de las vellosidades									
Infiltrado de macrófagos en la lámina propia									
Infiltrado de neutrófilos en la lámina propia									
Infiltrado de linfocitos en la lámina propia									

**ERIC-PCR.** Se realizó la prueba de reacción en cadena de la polimerasa del consenso intergénico de secuencias repetitivas de enterobacterias (ERIC-PCR). Los aislamientos fueron sometidos a esta prueba para determinar la clonalidad. Se emplearon los siguientes primers: ERIC 1R (5'-ATG TAA GCT CCTGGGGAT TCA C-3') y ERIC 2 (5'-AAG TAA GTG ACTGGGGTG AGC G-3') (Szczuka y Kaznowski, 2004). La mezcla de reacción consiste en 4µl de 10x buffer [750mMTris-HCl (pH 8.8), 200mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% Tween 20], 250 µM de concentración de cada dNTP, 50 pmol del primer ERIC 1R, 50 pmol del primer ERIC 2, 3.75 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 ng de DNA y 2 U de Taq polymerase (MBI Fermentas), ajustado a un volumen final de 25 µl de agua estéril. Las condiciones de la PCR fueron: desnaturalización durante 7' a 95 °C seguido de 30 ciclos de desnaturalización durante 30'' a 90° C, alineación durante 1' a 52° C, extensión durante 8'a 65° C y una extensión final de 16' a 65° C (Szczuka y Kaznowski, 2004).

**Análisis estadístico.** Los porcentajes de los resultados obtenidos de los aislamientos y las lesiones histopatológicas observadas, fueron analizados mediante la prueba de Chi cuadrado con una probabilidad de  $P < 0.05$  para determinar si existen diferencias significativas en los grupos infectados con las diferentes especies de *Aeromonas*; y la prueba de comparación múltiple tipo Tukey para determinar entre qué grupos existen diferencias (Nordgreen *et al.*, 2014.) Se empleó la prueba de Kaplan-Meier para comparar la supervivencia de los grupos, asimismo se empleó la prueba de Wilcoxon para compararlos; los datos fueron analizados por medio del programa estadístico IBM SPSS Statistics 21 (Zar, 1999)

## RESULTADOS

### a) Artículo publicado

#### CANADIAN JOURNAL OF VETERINARY RESEARCH



Canadian Journal of Veterinary Research es una revista científica internacional, que es publicada por la Asociación Canadiense de Medicina Veterinaria, publica resultados de investigaciones originales en la medicina veterinaria que incluyen temas de anatomía, fisiología, bioquímica, farmacología, microbiología, inmunología, patología, epidemiología y las ciencias clínicas.

Factor de impacto 0.85

Factor de impacto en 5 años 1.46

## Histopathological findings in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) naturally infected with 3 different *Aeromonas* species

Andrea Paloma Zepeda-Velázquez, Vicente Vega-Sánchez, Celene Salgado-Miranda, Edgardo Soriano-Vargas

### Abstract

This study describes the macroscopic and microscopic lesions in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) naturally infected with genetically identified *Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila*, and *A. veronii* species. The genus *Aeromonas* includes bacteria that naturally inhabit both waterways and organisms. At least 27 *Aeromonas* species have been identified to date, some of which can cause significant economic losses in aquaculture. As up to 68.8% of *Aeromonas* isolates may be misidentified in routine biochemical and phenotypic tests, however, reported cases of *Aeromonas* infection in fish may be wrongly identified. Our findings confirmed that the 3 *Aeromonas* species studied are associated with septicemia and dermal lesions in rainbow trout.

### Résumé

La présente étude décrit les lésions macroscopiques et microscopiques chez des truites arc-en-ciel d'élevage (*Oncorhynchus mykiss*) infectées naturellement avec des isolats identifiés génétiquement d'*Aeromonas salmonicida*, d'*A. hydrophila*, et d'*A. veronii*. Le genre *Aeromonas* inclut des bactéries qui habitent naturellement les cours d'eau et les organismes. Au moins 27 espèces d'*Aeromonas* sont identifiées à ce jour, quelques unes pouvant causer des pertes économiques significatives en aquaculture. Étant donné que jusqu'à 68,8 % des isolats d'*Aeromonas* peuvent être identifiés incorrectement lors des épreuves biochimiques et des tests phénotypiques, les cas rapportés d'infection à *Aeromonas* chez les poissons pourraient être faussement identifiés. Nos trouvailles confirment que les trois espèces d'*Aeromonas* étudiées sont associées avec des septicémies et des lésions dermiques chez des truites arc-en-ciel.

(Traduit par Docteur Serge Messier)

The genus *Aeromonas* of the family *Aeromonadaceae* includes bacteria that are pathogenic to fish and other animals. *Aeromonas* bacteria are also the etiologic agent responsible for a variety of infections in both immunocompetent and immunocompromised humans (1). In salmonids, *A. salmonicida* causes furunculosis, a disease characterized by skin ulcers and septicemia. Other *Aeromonas* species are involved in similar pathological conditions (2). Usually, the diagnosis is based on isolating a Gram-negative, motile or non-motile bacterium, identified mainly by routine phenotypic and biochemical tests.

To date, at least 27 species have been genetically identified and recognized in the genus *Aeromonas* (3–5). When the phenotypic identification of *Aeromonas* isolates is compared to the genetic identification, 35.5% to 68.8% of trout isolates may be misidentified (6,7). It is likely that the species could be incorrectly identified in some published reports of diseased salmonids, where *Aeromonas* was isolated and identified with phenotypic testing. The objective of this study was to describe the lesions observed in farmed rainbow trout that were naturally infected with 3 different species of *Aeromonas*, which were previously phenotypic and genetically identified (7,8).

Tissue samples from 5 farmed rainbow trout with lesions associated with *Aeromonas* infection were preserved in 10% neutral buffered formalin and processed, sectioned, and stained for routine histological examination. In all cases, no other bacterial agents or infectious pancreatic necrosis virus were identified. All *Aeromonas* species were genetically identified (7,8). In Case 1, the isolation of *A. veronii*, 2 fish, 16-to-18 cm long, raised in a concrete pond with spring water from a farm in Mexico State, were studied. Dermal erosion with exposition of premaxillary bone tissue was observed in both fish (Figure 1a). *A. veronii* was isolated from the gills of 1 fish and the dermal lesion of the other fish. In Case 2, isolation of the motile biovar of *A. salmonicida*, 1 fish, 17-cm long from a natural pond with spring water from a farm in Hidalgo State, was studied. A circular ulcer (13-mm diameter) was observed at the base of the right pelvic fin (Figure 2a). The isolation of *A. salmonicida* was obtained from the lesion. In Case 3, isolation of *A. hydrophila*, 1 fish, 18 cm-long, from a natural pond with spring water from a farm in Michoacan State, was studied. A circular dermal ulcer (7- × 8-mm diameter) was observed at the base of the left ventral fin, as well as petechias

Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca 50200, México.

Address all correspondence to Dr. Edgardo Soriano-Vargas; telephone/fax: +52 (722) 296-5555; e-mail: soriano@uaemex.mx

Received August 7, 2014. Accepted October 8, 2014.

Short communications

**Histopathological findings in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) naturally infected with 3 different *Aeromonas* species**

Andrea Paloma Zepeda-Velázquez<sup>1</sup>, Vicente Vega-Sánchez<sup>1</sup>, Celene Salgado-Miranda<sup>1</sup>, Edgardo Soriano-Vargas<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, México.

Running title: Pathology in trout infected with *Aeromonas* species.

\*Corresponding author: Edgardo Soriano-Vargas.

Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca 50200, México. Phone/Fax: +52 (722) 2965555; e-mail: soriano@uaemex.mx

## ABSTRACT

This study describes the macroscopic and microscopic lesions in farmed trout (*Oncorhynchus mykiss*) naturally infected with genetically identified *Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila*, and *A. veronii* species. The genus *Aeromonas* includes bacteria that naturally inhabit both waterways and organisms. At least 27 *Aeromonas* species have been identified to date, some of which can cause significant economic losses in aquaculture. As up to 68.8% of *Aeromonas* isolates may be misidentified in routine biochemical and phenotypic test, however, reported cases of *Aeromonas* infection in fish may be wrongly identified. Our findings confirmed that the *Aeromonas* species studied are associated with septicaemia and dermal lesion in rainbow trout.

KEY WORDS: *Aeromonas*, species, rainbow trout, Mexico.

The genus *Aeromonas* of the family *Aeromonadaceae* include pathogenic bacteria to fish and other animal species. Also, *Aeromonas* bacteria are the etiologic agent responsible for a variety of infections in both immunocompetent and immunocompromised humans (1).

In salmonids, *A. salmonicida* causes furunculosis, a disease characterized by skin ulcers and septicaemia. Other *Aeromonas* species are involved in similar pathological conditions (2). Usually, the diagnosis is based on the isolation of a Gram-negative, motile or non-motile bacterium, identified mainly by routine phenotypic and biochemical tests. Up to date, at least 27 species are genetically identified and recognized in the genus *Aeromonas* (3, 4, 5). When the phenotypic identification of *Aeromonas* isolates is compared to the genetic identification, 35.5% to 68.8% of trout isolates may be misidentified (6, 7). It is likely that some published reports of diseased salmonids, where *Aeromonas* was isolated and phenotypic identified, the species could be incorrectly identified. Hence, the aim of the current study was to describe the lesions observed in farmed rainbow trout naturally infected with three *Aeromonas* species, previously phenotypic and genetically identified (7,8).

History of clinical cases. Tissue samples from four farmed rainbow trout fish with lesions associated to *Aeromonas* infection were preserved in 10% neutral buffered formalin and processed, sectioned and stained for routine histological examination. In all cases, no other bacterial agents or infectious pancreatic necrosis virus were identified. All *Aeromonas* species were genetically identified (7, 8). Case 1: isolation of *A. veronii*. Two fish, 16 to 18 cm length, raised into a concrete pond with spring water from a farm in México State were studied. Dermal erosion with exposition of premaxilla bone tissue was observed in both fish (Figure 1a). Isolation of *A. veronii* was from gills of one fish and dermal lesion in the other fish. Case 2: isolation of *A. salmonicida*, motile



biovar. One fish, 17 cm length from a rustic pond with spring water from a farm located in Hidalgo State was studied. A 13-mm, circular ulcer located at the base of the right pelvic fin was observed (Figure 2a). The isolation of *A. salmonicida* was obtained from the lesion. Case 3: isolation of *A. hydrophila*. One fish, 18 cm length, from a rustic pond with spring water from a farm located in Michoacán State was studied. A circular dermal ulcer located at the base of the left ventral fin, 7 x 8 mm diameter, was observed. Petechias and desquamation around the affected area were observed (Figure 3a). Case 4: isolation of *A. veronii*. One fish, 16 cm length, from a rustic pond with river water from a farm located at the Hidalgo State was studied. A conspicuous epidermal erosion of the dorsal fin was observed. The isolation of *A. veronii* was carried out from the lesion, kidney, and liver.

Findings of cases. Case 1: At the histological study, a predominant macrophage infiltration with scattered neutrophils, edema, few melanomacrophage centers (MMC) and free-melanine in the limits of the epidermal lesion were observed (Figure 1b). In liver, severe hyperemia and haemorrhages in parenchyma (Figure 1c) with a few MMC were observed (Figure 1d). Bacterial rods resembling *Aeromonas* spp., perivascular located were observed. In kidney, a moderate interstitial MMC infiltration was observed (Figure 1e).

Case 2: At the histological study, a predominant macrophage infiltration, blood vessel capillary hyperemia and edema of the dermis were observed (Figure 2b). In liver, a slight lymphocyte infiltration in the periphery of the biliary ducts and moderate hepatocellular degeneration were observed (Figure 2c). In kidney, a slight interstitial infiltration of MMC was observed (Figure 2d).

Case 3: At the epidermis, histopathological findings included inflammatory infiltration of

macrophages predominantly and edema (Figure 3b). At the Gram staining of the same tissue, a bacterial rod resembling *Aeromonas* spp. was observed (Figure 3c). In liver, a centrilobular located, slight MMC infiltration, severe hepatocellular degeneration (Figure 3d) and slight lymphocyte infiltration centrilobular located were observed (Figure 3e). In kidney, a severe interstitial infiltration of MMC was observed (Figure 3f).

Case 4: At the histological study, inflammatory infiltration of neutrophils, macrophages and MMC were observed (Figure 4a). In liver, moderate centrilobular hyperemia, slight perivascular MMC infiltration and slight hepatocellular degeneration were observed (Figure 4b).

In all the studied fish, the histopathological findings in gills included hyperplasia of epithelial cells located at the base and apical portions, loss of normal architecture with different degrees of severity in multifocal areas, telangiectasia and edema. Observed lesions in gills may not be associated to *Aeromonas* infection, as other aquatic factors (for example, water quality and toxics) may produce similar lesions (9).

The histopathological findings of this study confirmed that several *Aeromonas* species are pathogenic to the rainbow trout. In general, dermal lesions are associated with the *Aeromonas* infection in fish (10, 11, 12, 13, 14). Particularly, the ulcer observed at the base of the pelvic fin in one fish (Figure 2a) with isolation of the motile biovar of *A. salmonicida*, appears a frequent lesion in the cases of furunculosis produced by this *Aeromonas* species (2). Similarly, vascular congestion and cytoplasmic vacuolization of hepatocytes in experimentally infected rainbow trout with *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* have been reported (15). In the case 2 of present study, the inflammatory lesions observed in liver and kidney indicates a septicemic potential of the motile biovar of *A. salmonicida*. Also, the species *A. veronii* and *A. hydrophila* have been associated with diseases in ornamental and farmed fish (16, 17).

In conclusion, our findings confirmed that the *Aeromonas* species *A. hydrophila*, *A. salmonicida* and *A. veronii* are associated with septicemia and dermal lesions in rainbow trout. Our results may guide future reports in rainbow trout where an *Aeromonas* species could be involved.

## ACKNOWLEDGMENTS

Andrea Paloma Zepeda-Velázquez is a Ph. D. student at the Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM) and was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Mexico. The authors kindly thank to CONACYT for their support at the Project CB-2008-01-103142 (UAEM 1900/2010C).

## References

1. Janda JM, Abbott SL. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. Clin Microbiol Rev 2010; 23:35-73.
2. Austin B, Austin DA. Bacterial fish pathogens. Diseases of farmed and wild fish. 4th ed. UK: Praxis Publishing Ltd, 2007.
3. Martínez-Murcia A, Beaz-Hidalgo R, Svec P, Saavedra MJ and others. *Aeromonas cavernicola* sp. nov., isolated from fresh water of a brook in a cavern. Curr Microbiol 2013; 66:197-204.
4. Aravena-Román M, Beaz-Hidalgo R, Inglis TJ, Riley TV, Martínez-Murcia AJ and others. *Aeromonas australiensis* sp. nov., isolated from irrigation water. Int J Syst Evol Microbiol 2013; 63:2270-2276.

5. Beaz-Hidalgo R, Martínez-Murcia A, Figueras MJ. Reclassification of *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* Huys *et al.* 2002 and *Aeromonas aquariorum* Martínez-Murcia *et al.* 2008 as *Aeromonas dhakensis* sp. nov. comb. nov. and emendation of the species *Aeromonas hydrophila*. *Syst Appl Microbiol* 2013; 36:171-176.
6. Beaz-Hidalgo R, Alperi A, Buján N, Romalde JL and others Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. *Syst Appl Microbiol* 2010; 33:149-153.
7. Vega-Sánchez V, Latif-Eugenín F, Beaz-Hidalgo R, Figueras MJ and others Re-identification of *Aeromonas* isolates from rainbow trout and incidence of class I integron and  $\beta$ -lactamase genes. *Vet Microbiol* 2014b; in press.
8. Vega-Sánchez V, Acosta-Dibarrat J, Vega-Castillo F, Castro-Escarpulli G and others. Phenotypical characteristics, genetic identification, and antimicrobial sensitivity of *Aeromonas* species isolated from farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Mexico. *Acta Trop* 2014; 130:76-79.
9. Dymowska AK, Hwang PP, Goss GC. Structure and function of ionocytes in the freshwater fish gill. *Respir Physiol Neurobiol* 2012; 184:282-292.
10. Brocklebank JR. Ulcerative dermatitis caused by *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* in farmed Atlantic salmon in British Columbia. *Can Vet J* 1998; 39:110.
11. Řehulka J. *Aeromonas* causes severe skin lesions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): clinical pathology, haematology and biochemistry. *Acta Vet Brno* 2002; 71:351-360.
12. Burr SE, Pugovkin D, Wahli T, Segner H and others. Attenuated virulence of an *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* type III secretion mutant in a rainbow trout model. *Microbiology* 2005; 151:2111-2118.

13. Goldschmidt-Clermont E, Hochwartner O, Demarta A, Caminada AP and others. Outbreaks of an ulcerative and haemorrhagic disease in Arctic char *Salvelinus alpinus* caused by *Aeromonas salmonicida* subsp. *smithia*. Dis Aquat Org 2009; 86:81-86.
14. Harikrishnan R, Balasundaram C, Moon YG, Kim MC and others. Phytotherapy of ulcerative dermatitis induced by *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish (*Carassius auratus*). Acta Vet Hung 2010; 58:29-37.
15. Kozińska A. Dominant pathogenic species of mesophilic aeromonads isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. J Fish Dis 2007; 30:293-301.
16. Pridgeon JW, Klesius PH, Mu X, Carter D and others. Identification of unique DNA sequences present in highly virulent 2009 Alabama isolates of *Aeromonas hydrophila*. Vet Microbiol 2011; 152:117-125.
17. Sreedharan K, Philip R, Singh ISB. Characterization and virulence potential of phenotypically diverse *Aeromonas veronii* isolates recovered from moribund freshwater ornamental fishes of Kerala, India. Antonie van Leeuwenhoek 2013; 103:53-67.

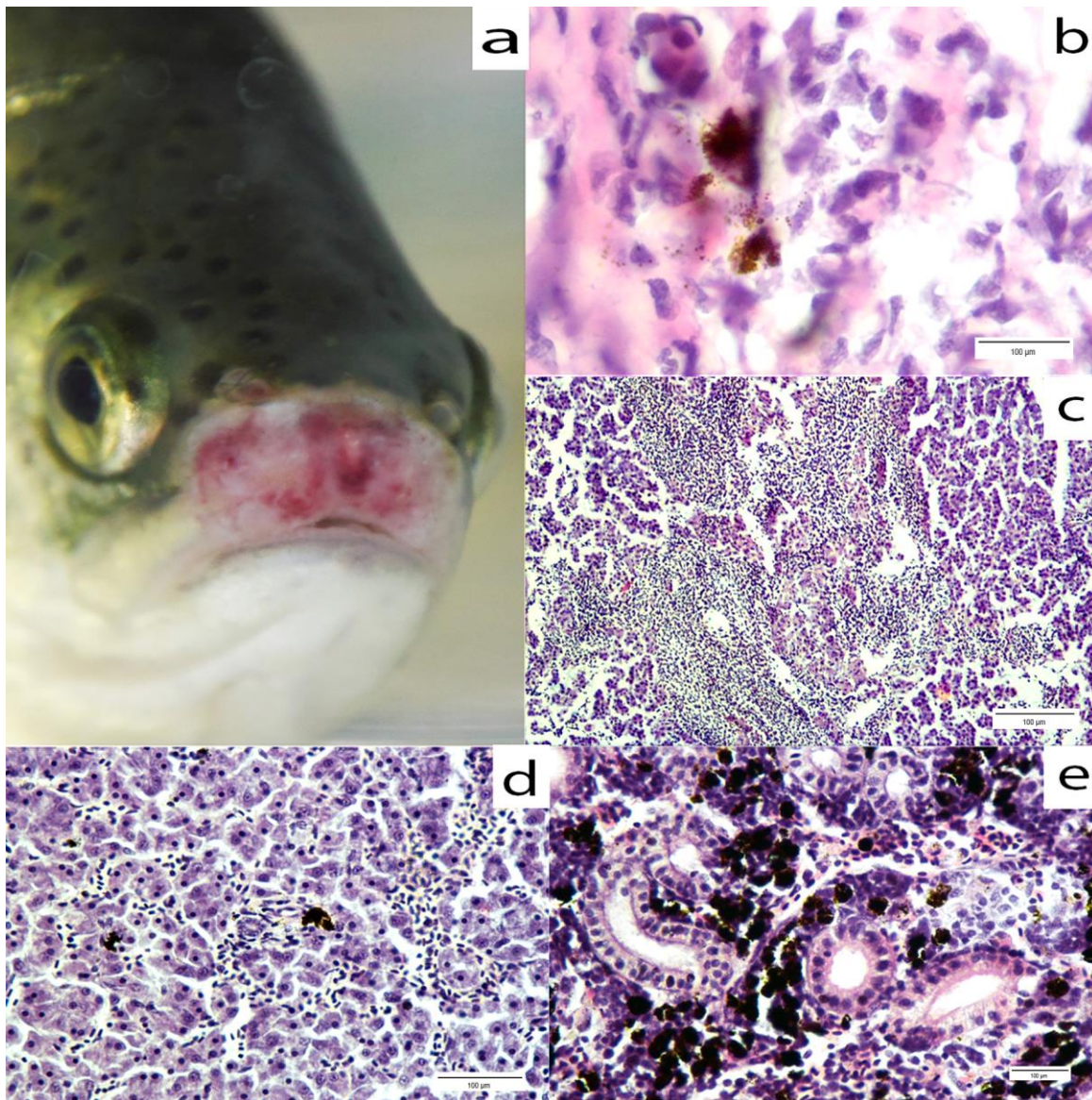


Figure 1. Macroscopic and microscopic lesions in rainbow trout naturally infected with *A. veronii*. a) Erosion of dermis and exposition of premaxilar bone tissue. b) Premaxilar dermis with inflammatory infiltration, edema and free-melanine (Hematoxilin-Eosin). c) Liver, extensive hemorrhage in parenchyma (Hematoxilin-Eosin). d) Liver, slight MMC centrolobulillar infiltration, degeneration and hepatocellular necrosis (Hematoxilin-Eosin). e) Kidney, moderate MMC interstitial infiltration (Hematoxilin-Eosin).

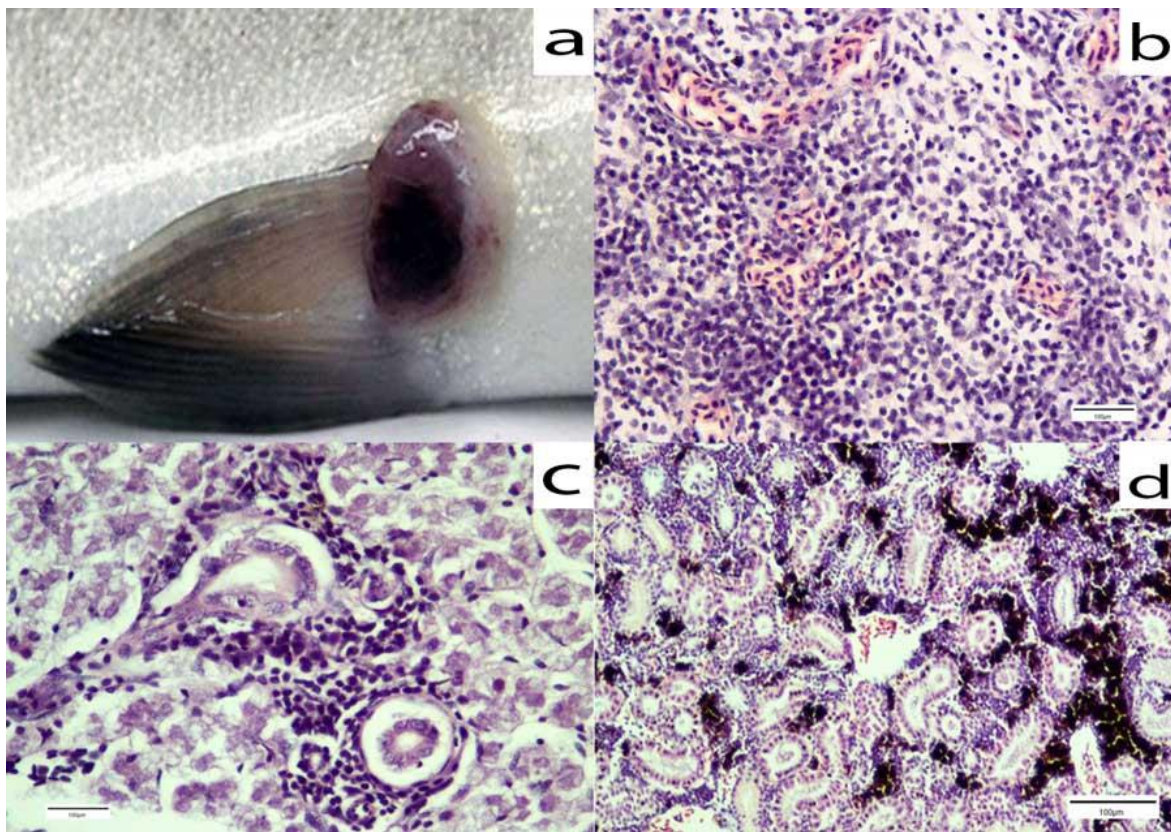


Figure 2. Macroscopic and microscopic lesions in rainbow trout naturally infected with the motile biovar of *A. salmonicida*. a) Ulcer at the base of the right pelvic fin. b) Dermis, infiltration of macrophages, hyperemia and edema in the affected area (Hematoxylin-Eosin). c) Liver, slight periportal lymphocyte infiltration and moderate hepatocellular degeneration (Hematoxylin-Eosin). d) Kidney, slight melanomacrophage center (MMC) interstitial infiltration (Hematoxylin-Eosin).

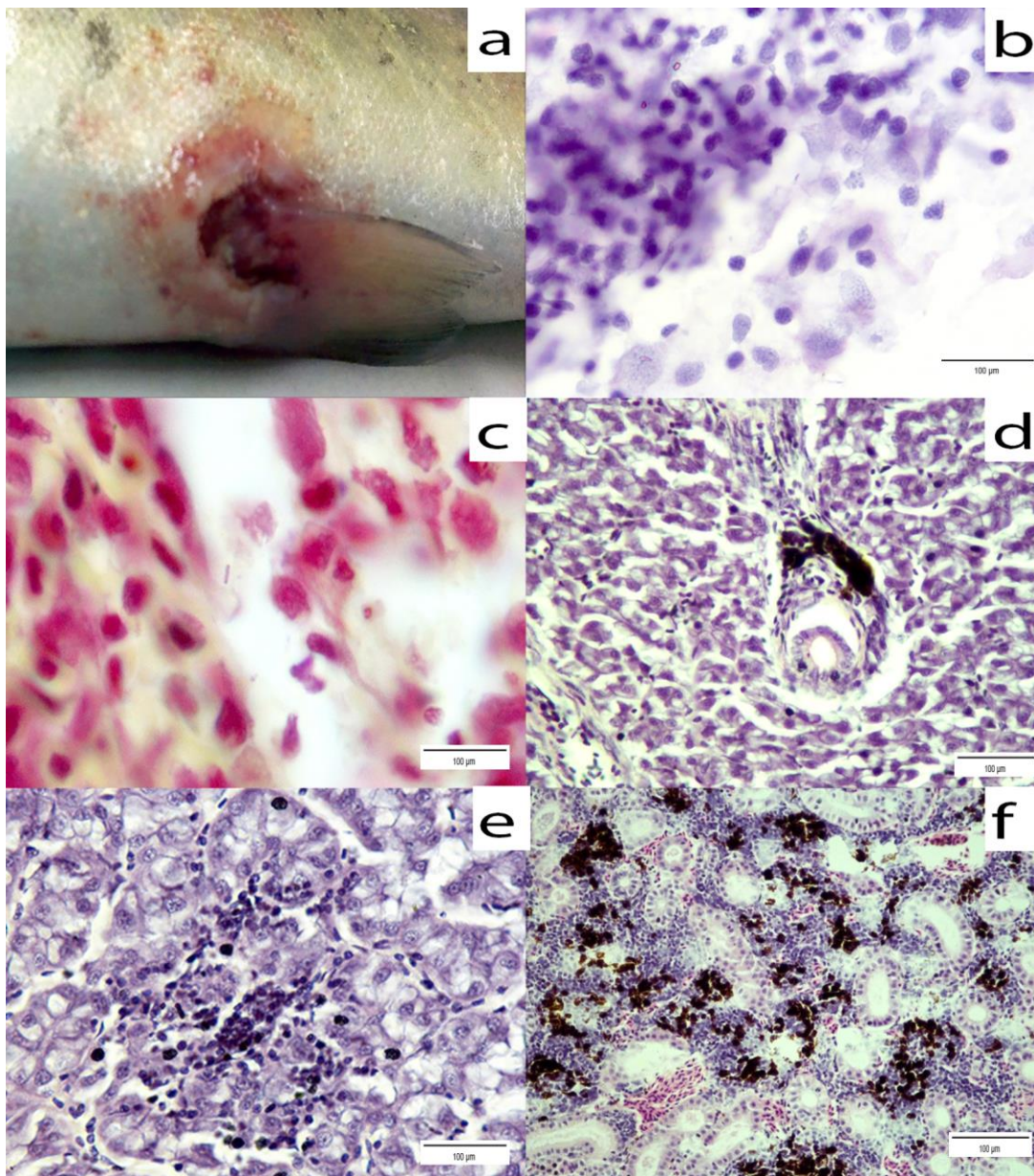


Figure 3. Macroscopic and microscopic lesions in rainbow trout naturally infected with *A. hydrophila*. a) Ulcer at the base of the left ventral fin. b) Dermis, macrophage infiltration and edema (Hematoxylin-Eosin). c) Gram-negative rod resembling *Aeromonas* spp. in dermis (Gram stain). d) Liver, MMC infiltration in the periphery of biliary ducts and hepatocellular degeneration (Hematoxylin-Eosin). e) Liver, lymphocyte infiltration in parenchyma (Hematoxylin-Eosin). f) Kidney, severe MMC infiltration (Hematoxylin-Eosin).



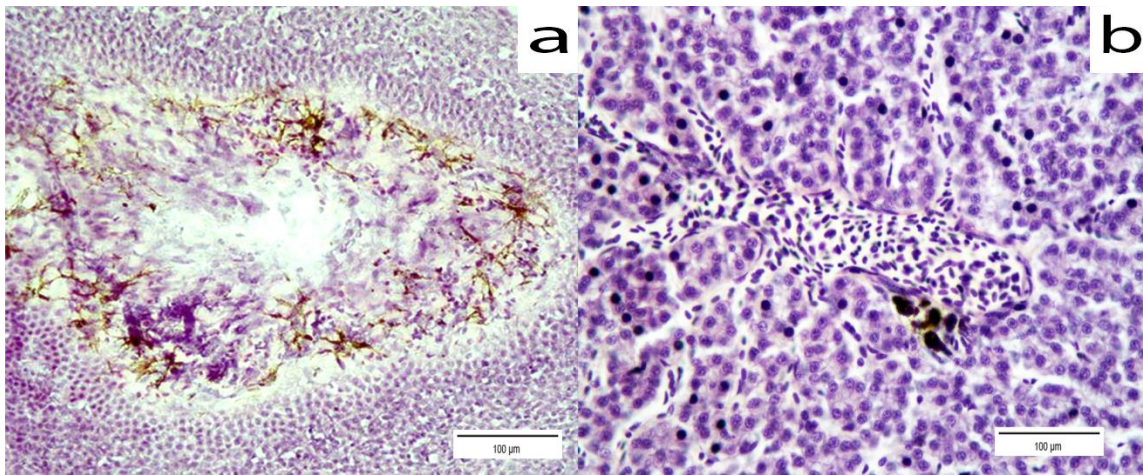
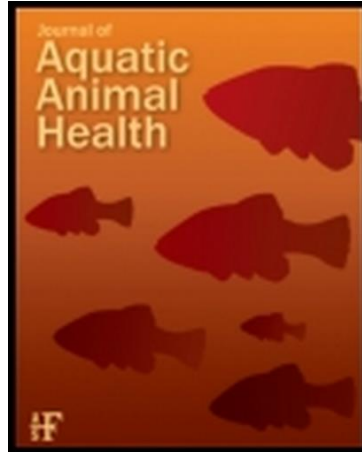


Figure 4. Macroscopic and microscopic lesions in rainbow trout naturally infected with *A. veronii*.  
a) Erosion of dorsal fin, moderate MMC infiltration (Hematoxylin-Eosin). b) Liver, hyperemia in parenchyma, MMC infiltration and hepatocellular degeneration (Hematoxylin-Eosin).

b) Artículo enviado

### **Journal of Aquatic Animal Health**



Journal of Aquatic Animal Health, es una revista internacional que es publicada bajo la dirección de la División de Salud de Peces de la Sociedad Americana de Pesca. Publica trabajos de investigación sobre: causas, efectos, tratamientos y prevención de enfermedades de organismos marinos y de agua dulce. Las investigaciones abarcan temas de bioquímica, fisiología, evaluación de impactos ambientales y patógenos.

Factor de impacto 0.968.

Factor de impacto en 5 años 1.172

## Communication

### Virulence of ten species of *Aeromonas* in experimentally infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Andrea Paloma Zepeda-Velázquez<sup>1</sup>, Vicente Vega-Sánchez<sup>2</sup>, César Ortega-Santana<sup>1</sup>, Miguel Rubio-Godoy<sup>3</sup>, Dany Montes de Oca-Mira<sup>1</sup>, Edgardo Soriano-Vargas<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca 50200, México.

<sup>2</sup>Ingeniería en Biotecnología, Universidad Politécnica del Valle de Toluca, Toluca 50904, Estado de México, México

<sup>3</sup>Instituto de Ecología, A.C., Red de Biología Evolutiva, km 2.5 antigua carretera a Coatepec, Xalapa 91070, Veracruz, México.

Short title: Virulence of ten *Aeromonas* species

Corresponding author: Edgardo Soriano Vargas\*

Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM). Carretera Toluca-Atlacomulco km 12, Toluca, 50200, Estado de México, México.

Telephone/Fax: + 52 (722) 2965555. Email: soriano@uaemex.mx

## Abstract

The pathogenicity and virulence of 10 species of *Aeromonas* in rainbow trout fry experimentally infected by immersion were investigated. The species *A. bestiarum*, *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, and *A. veronii* produced significantly different mortality and liver microscopic lesions compared to the other *Aeromonas* species assayed in the study. All inoculated *Aeromonas* species were reisolated from the liver of exposed fish, indicating successful infection. Hepatic congestion was observed in fish infected with *A. allosaccharophila*, *A. caviae*, “*A. lusitana*”, *A. popoffii*, and *A. sobria*, indicating their pathogenic potential.

Key words: bacteria, *Aeromonas*, rainbow trout, virulence.

## Introduction

The genus *Aeromonas* of the family *Aeromonadaceae* includes bacteria that are pathogenic to fish and other animals. These bacteria are also involved in a variety of infections in both immunocompetent and immunocompromised humans (Janda and Abbott 2010).

To date, at least 30 species have been genetically identified and recognized in the genus *Aeromonas* (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2015). A number of species of *Aeromonas* have been isolated from aquatic environments, and are known to be opportunistic and the cause of severe outbreaks (Aravena-Román *et al.*, 2013; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2013; Martínez-Murcia *et al.*, 2013). *Aeromonas hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. veronii*, *A. caviae* and *A. salmonicida* are the main species involved in pathological conditions in salmonids. In particular, *A. salmonicida* has been known as the etiologic agent of furunculosis, a skin ulcerative and septicemic disease (Austin and Austin 2007).

Ten genetically-identified species of *Aeromonas* have been isolated from farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Mexico: *A. bestiarum*, *A. hydrophila*, *A. media*, *A. popoffii*, *A. salmonicida*, *A. sobria*, and *A. veronii* were isolated from skin lesions or internal tissues; while *A. allosaccharophila*, *A. caviae*, and “*A. lusitana*” were isolated only from gills or intestine of healthy fish (Vega-Sánchez *et al.*, 2014a, 2014b; Zepeda-Velázquez *et al.*, 2015). The pathogenic potential to trout posed by these species of *Aeromonas* isolated from healthy fish is unknown.

Hence, the aim of the present study was to determine the pathogenicity and virulence of the 10 *Aeromonas* species previously isolated from farmed rainbow trout in Mexico.

## Methods

Ten well-characterized *Aeromonas* species isolated from healthy and diseased, farmed rainbow trout (*O. mykiss*) in Mexico were included in the study (Table 1): *A. allosaccharophila*, *A. bestiarum*, *A. caviae*, *A. hydrophila*, “*A. lusitana*”, *A. media*, *A. popoffii*, *A. salmonicida* motile biotype, *A. sobria* and *A. veronii* (Vega-Sánchez *et al.*, 2014a; 2014b; Zepeda-Velázquez *et al.*, 2015).

All bacterial isolates were cultured on tryptic soy agar (TSA) and incubated at 25°C for 24 hours. Subsequently, isolates were cultured in 300 ml tryptic soy broth (TSB) and incubated under the same conditions for a further 24 hours. Optical density (OD) of bacterial stock was measured by spectrophotometry at 540 nm and adjusted to an OD of 1.0. The adjusted bacterial stock was centrifuged at 10,000 rpm for 20 minutes. Subsequently, the supernatant was eliminated and the bacterial pellet was resuspended in 300 ml of fresh TSB (Pridgeon *et al.*, 2011). A volume of 100 µl of bacterial stock was serially diluted on TSA plates to determine colony-forming units per ml (CFU/ml).

To determine the pathogenicity and virulence of the 10 *Aeromonas* isolates included in the study, rainbow trout fry (3-5 centimeters) were obtained from a single farm (El Zarco, Ocoyoacac, Mexico). The farm employs spring water and has no clinical history of *Aeromonas* infection. A total of 990 rainbow trout fry were included in the study. Fish were maintained for two weeks prior to the experimental period in aerated, 100-liter container tanks with chlorine-free water, equipped with an activated carbon filter and supplied with flowing water at 15± 0.5 °C. Fish were pellet-fed (El Pedregal, Silver Cup, Toluca, Mexico) once at day with an amount equivalent to 1.7 grams (gr) per day (Paniagua *et al.*, 1990). The experimental design consisted of 10 experimental groups (one for

each *Aeromonas* species) and one uninfected group. All experimental groups were handled and kept independently (Pridgeon *et al.*, 2011). Each experimental group consisted of 30 fry by triplicate. Fish were placed in 6-liter glass aquaria with 2700 ml of chlorine-free water. Infection of fish were carried out with 300 ml of bacterial stock adjusted to  $1.5 \times 10^8$  CFU/ml added to the aquaria with non-circulating water, for a total volume of 3 liters. After 1 hour of immersion bath, fry were placed into new aquaria with 6 liters of fresh, chlorine-free water. The uninfected, control group was treated exactly the same way, but was exposed to 300 ml of sterile TSB. Two fry from each aquarium were euthanized at 1, 2, 3, 4, and 5 hours post-exposure. Further 5 fry were euthanized at 1, 2, 7, and 14 days post-exposure. During the 14 days after exposure, fish were checked daily, and moribund fish and those with severe clinical signs (abnormal swimming behavior, anorexia and hyperpigmentation) were immediately euthanized by an overdose of tricaine methane sulfonate (MS222; Fiquel), independently of set sampling days (Noga, 2010). Tissue samples from gills, liver, kidney, spleen, and intestine were collected from euthanized fish and fixed in 10% neutral buffered formalin for 24-72 hours, embedded in paraffin, sectioned and stained for routine histological examination. To confirm clonality of inoculated bacteria, an enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction assay was performed to reisolated *Aeromonas* as described elsewhere (Szczyka and Kaznowski 2004).

To determine differences of virulence between *Aeromonas* isolates, percentages of fish with histological lesions and positive bacteriological isolation of inoculated bacteria, and mortality were analyzed by chi-square test ( $\alpha=0.05$ ) (Holten-Andersen *et al.*, 2012). Survival plots of infected fish were determined by Kaplan-Meier and compared with a Wilcoxon test (Zar, 1999).

## Results

Abnormal swimming behavior and external clinical signs (anorexia and hyperpigmentation) were observed in fish exposed to isolates of *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *A. veronii*, and *A. bestiarum* at the same day of inoculation. No external clinical signs were observed in the groups exposed to isolates of *A. allosaccharophila*, *A. caviae*, “*A. lusitana*”, *A. media*, *A. popoffii*, and *A. sobria*. No external and internal clinical signs, neither macroscopic nor microscopic lesions were observed in the uninfected control group (Table 1). During 14 days post-exposure, no mortality was recorded in fish groups infected with *A. allosaccharophila*, “*A. lusitana*”, *A. media*, *A. popoffii* and the uninfected group (Figure 1). Fish infected with *A. sobria* and *A. caviae* showed higher survival (mean calculated survival time 12 and 7 days, respectively) compared with those exposed to *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, and *A. veronii* (all three of which induced mortality starting on inoculation day), and to *A. bestiarum* (Figure 1). There was significant difference between *A. salmonicida* (17 fish died with a highest rate at 3 hours post-exposure), *A. hydrophila* (11 fish died with a highest rate at 7 days post-exposure), *A. bestiarum* and *A. veronii* (8 fish died, both with a highest rate at 2 days post-exposure) compared with *A. caviae* (3 fish died with a highest rate at 11 days post-exposure) and *A. sobria* (1 fish died with a highest rate at 11 days post-exposure), respect to survival ( $p = 0.024$ ;  $Z = -2.20$ ). The statistical differences on mortality analysis corroborate the data obtained of survival plots, *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *A. bestiarum* and *A. veronii* were the most virulent species than kill fry trout by immersion bath (Figure 1).

Structural changes in gills of all fish with different severity grades was observed, severe to moderate hyperplasia of epithelial cells, basal, apical or both, lamellar fusions, general congestion of secondary lamellas and epithelial lifting of the secondary lamellae were observed in on fish



infected with *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *A. veronii* and *A. bestiarum*. Mild gill congestion were observed on fish infected with *A. caviae* and *A. sobria*.

Internal clinic signs were observed, hepatic congestion with different degrees of severity was observed in all groups infected. Fish exposed to *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *A. veronii*, *A. bestiarum*, *A. caviae* and *A. sobria* (severe to mild); while mild hepatic congestion was observed in fish exposed to *A. allosaccharophila*, *A. caviae*, *A. popoffii* and *A. sobria* (all before 7 days post-exposure). Coccobacilli shapes were not observed in hepatic tissue.

Petechial hemorrhages in the ventral part of the opercula and the ventral surface near the anus were only observed in one fish infected with *A. salmonicida* at one day post-exposure. However, classic skin furunculosis lesion was not observed on fish exposed to *A. salmonicida*. Unilateral exophthalmia, mild ocular hemorrhage and severe pale liver were observed in fish infected with *A. hydrophila* and *A. veronii* (Figures 2 and 3).

Bacterial reisolations of the *Aeromonas* species included in the study were isolated from gills and distal intestine during the experimental period. Bacterial reisolation was most frequent from liver (Table 1). No histopathological lesions were significant on spleen and kidney ( $P < 0.05$ ) and the presence of coccobacilli shapes were not observed. A clonal relationship between reisolated and inoculated bacteria was obtained in the different experimental groups.

## **Discussion**

Here, we show that isolates of the species *A. bestiarum*, *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, and *A. veronii* produced mortality and liver microscopic lesions in *O. mykiss* fry exposed by immersion.

Isolates of these *Aeromonas* species were originally obtained from skin lesions in farmed rainbow trout (Zepeda-Velázquez *et al.*, 2015).

In the present study, petechial hemorrhages in the ventral zone around the opercula and the caudal zone were observed in fish infected with *A. salmonicida*, as reported elsewhere (Austin and Austin 2007). We also observed ocular lesions in fish infected with *A. hydrophila* and *A. veronii*, as similar reported in ayu (*Plecoglossus altivelis*) and Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) following an outbreak (Miyazaki and Jo 1985; Moustafa *et al.*, 2010). Fish mortality was accompanied by liver congestion with different levels of severity, mainly in fish infected with the following *Aeromonas* species: *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *A. veronii*, *A. bestiarum*, *A. sobria* and *A. caviae*.

Also the continuous isolation of gills and liver isolations obtained suggest that *Aeromonas* spp. used in this work, hematic route was used to spread in the host. The histological changes identified in gills of infected fish suggest the ability of these isolations to produce virulence factors that enable them to evade the immune response, protecting the bacteria and cause histopathological lesions capable of causing the death of the fish by asphyxia (Tobback *et al.*, 2009).

No bacteria were observed in liver tissue, suggesting that bacterial replication occurred on another site and bacteria later spread to liver (Miyazaki and Jo 1985); therefore, bacterial replication and extracellular products likely induce systemic hemodynamic changes, as when a septic process is development (Rey *et al.*, 2009). Although, isolates from liver were obtained from infected fish with *Aeromonas* species included in the study, the presence of coccobacilli shapes in liver tissue was not observed as reported as elsewhere (Farto *et al.*, 2011). Identification of virulence factors in the virulent *Aeromonas* species identified in the present study is needed.

In conclusion, differences in the pathogenicity and virulence of ten *Aeromonas* species to rainbow trout fry included in the study were determined. Mexican isolates of *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *A. veronii* and *A. bestiarum* were the most virulent *Aeromonas* species to rainbow trout fry. This study is the base for further studies on the different *Aeromonas* species found in the cultured Mexican rainbow trout.

## References

- Aravena-Román, M., Beaz-Hidalgo, R., Inglis, T.J.J., Riley, T.V., Martínez-Murcia, A.J., Chang, B.J., and Figueras, M.J. 2013. *Aeromonas australiensis* sp. nov., isolated from irrigation water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63:2270-2276.
- Austin, B., and Austin, D.A. 2007. *Bacterial fish pathogens, diseases of farmed and wild fish*. 4th edition. Praxis Publishing Ltd, Chichester, UK.
- Beaz-Hidalgo, R. and Figueras, M.J., 2013. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. *Journal of Fish Diseases*, 36:371-388.
- Beaz-Hidalgo, R., Latif-Eugenín, F., Hossain, M.J., Berg, K., Niemi, R.M., Rapala, J., Lyra, C., Liles, M.R., and Figueras, M.J. 2015. *Aeromonas aquatica* sp. nov., *Aeromonas finlandiensis* sp. nov. and *Aeromonas lacus* sp. nov. isolated from Finnish waters associated with cyanobacterial blooms. *Systematic and Applied Microbiology* 38:161-168.
- Beaz-Hidalgo, R., Martínez-Murcia, A., and Figueras, M.J. 2013. Reclassification of *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* Huys et al. 2002 and *Aeromonas aquariorum* Martínez-Murcia et al. 2008 as *Aeromonas dhakensis* sp. nov. comb. nov. and emendation of the species *Aeromonas hydrophila*. *Systematic and Applied Microbiology* 36:171-176.

- Farto, R., Milton, D.L., Bermúdez, M.B., Nieto, T.P. 2011. Colonization of turbot tissues by virulent and avirulent *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* strains during infection. *Diseases of Aquatic Organisms* 95:167-173.
- Holten-Andersen, L., Dalsgaard, I., and Buchmann, K. 2012. Baltic salmon, *Salmo salar*, from Swedish River Lule Älv is more resistant to furunculosis compared to rainbow trout. *PLoS One* 7:e29571.
- Janda, J.M., and Abbott, S.L. 2010. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical Microbiology Reviews* 23:35-73.
- Jutfelt, F., Olsen, R.E., Glette, J., Ringø, E., Sundell, K. 2006. Translocation of viable *Aeromonas salmonicida* across the intestine of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 29:255-262.
- Martínez-Murcia, A., Beaz-Hidalgo, R., Svec, P., Saavedra, M.J., Figueras, M.J., and Sedlacek, I. 2013. *Aeromonas cavernicola* sp. nov., isolated from fresh water of a brook in a cavern. *Current Microbiology* 66:197-204.
- Miyazaki, T., and Jo, Y. 1985. A histopathological study of motile aeromonad disease in ayu. *Fish Pathology* 20:55-59.
- Moustafa, E.M., Naota, M., Morita, T., Tange, N., Shimada, A. 2010. Pathological study on the scuticociliatosis affecting farmed Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 72:1359-1362.
- Noga, E.J. 2010. *Fish disease, diagnosis and treatment*. 2<sup>nd</sup> edition. Wiley-Blackwell, USA.
- Paniagua, C., Rivero, O., Anguita, J., and Naharro, G. 1990. Pathogenicity factors and virulence for rainbow trout (*Salmo gairdneri*) of motile *Aeromonas* spp. isolated from a river. *Journal of Clinical Microbiology* 28:350-355.

- Pridgeon, J.W., and Klesius, P.H. 2011. Virulence of *Aeromonas hydrophila* to channel catfish *Ictalurus punctatus* fingerlings in the presence and absence of bacterial extracellular products. *Diseases of Aquatic Organisms* 95:209-215.
- Rey, A., Verjan, N., Ferguson, H.W., Iregui, C. 2009. Pathogenesis of *Aeromonas hydrophila* strain KJ99 infection and its extracellular products in two species of fish. *Veterinary Record* 164:493-499.
- Szczuka, E., and Kaznowski, A. 2004. Typing of clinical and environmental *Aeromonas* sp. strains by random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR, and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 42:220-228.
- Vega-Sánchez, V., Acosta-Dibarrat, J., Vega-Castillo, F., Castro-Escarpulli, G., Aguilera-Arreola, M.G., and Soriano-Vargas, E. 2014a. Phenotypical characteristics, genetic identification, and antimicrobial sensitivity of *Aeromonas* species isolated from farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Mexico. *Acta Tropica* 130:76-79.
- Vega-Sánchez, V., Latif-Eugenín, F., Soriano-Vargas, E., Beaz-Hidalgo, R., Figueras, M.J., Aguilera-Arreola, M.G., and Castro-Escarpulli, G. 2014b. Re-identification of *Aeromonas* isolates from rainbow trout and incidence of class 1 integron and  $\beta$ -lactamase genes. *Veterinary Microbiology* 172:528-533.
- Zar, JH. 1999. *Biostatistical Analysis*. 4<sup>th</sup> edition. Prentice Hall. Upper Saddle River, USA.
- Zepeda-Velázquez, A.P., Vega-Sánchez, V., Salgado-Miranda, C., and Soriano-Vargas, E. 2015. Histopathological findings in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) naturally infected with 3 different *Aeromonas* species. *Canadian Journal of Veterinary Research* 79:250-254.

## **Acknowledgements**

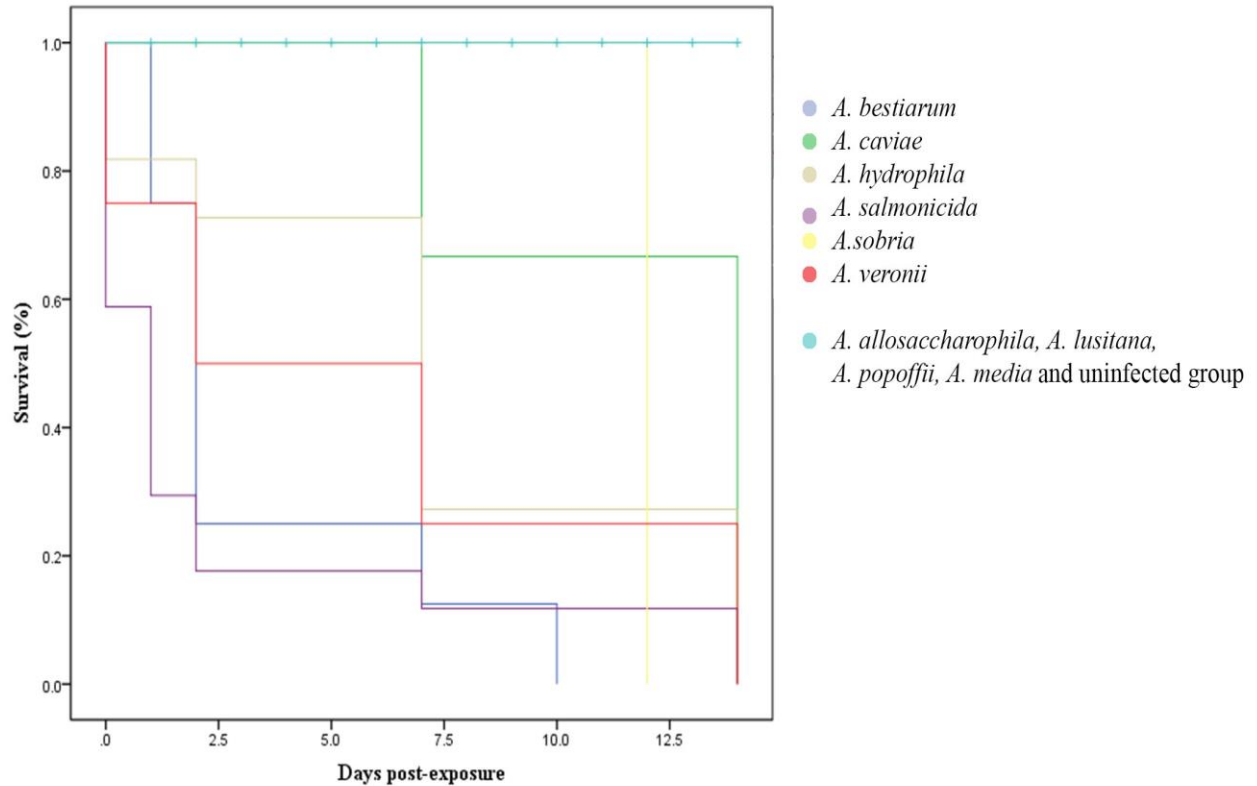
Andrea Paloma Zepeda-Velázquez is a Ph. D. student at the Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM) and was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Mexico (265289). This work was supported by CONACYT, Project CB-2008-01-103142 (UAEM 1900/2010C). MVZ Claudia Alexandri Cortés, Laboratorio de Histopatología (CIESA, FMVZ, UAEM) is greatly acknowledged for her technical support.

**Table 1.** Origin and species of *Aeromonas* isolates and microscopic lesions, bacterial re-isolation, and morbidity of rainbow trout exposed to different *Aeromonas* included in the study.

<i>Aeromonas</i> (isolate identification)	species	Origin	Mortality, %	Percentage of fish with microscopic lesions in liver	Percentage of fish with bacterial re- isolation from liver
A. <i>allosaccharophila</i> (ESV-385)		Gill	0.0 <sup>a</sup>	83.3 <sup>b</sup>	32.2 <sup>b</sup>
A. <i>bestiarum</i> (ESV-365)		Skin lesion	8.8 <sup>b</sup>	55.5 <sup>b</sup>	24.4 <sup>b</sup>
A. <i>caviae</i> (ESV-378)		Gill	3.3 <sup>a</sup>	34.4 <sup>b</sup>	12.2 <sup>b</sup>
A. <i>hydrophila</i> (ESV-394)		Skin lesion	12.2 <sup>b</sup>	60.0 <sup>b</sup>	41.1 <sup>b</sup>
“A. <i>lusitana</i> ” (ESV-351)		Gill	0.0 <sup>a</sup>	66.6 <sup>b</sup>	17.7 <sup>b</sup>
A. <i>media</i> (ESV-398)		Spleen	0.0 <sup>a</sup>	27.7 <sup>a</sup>	64.4 <sup>b</sup>
A. <i>popoffii</i> (ESV-354)		Kidney	0.0 <sup>a</sup>	52.2 <sup>b</sup>	86.6 <sup>b</sup>
A. <i>salmonicida</i> (ESV-396)		Skin lesion	18.8 <sup>b</sup>	68.8 <sup>b</sup>	35.5 <sup>b</sup>
A. <i>sobria</i> (ESV-369)		Kidney	1.1 <sup>a</sup>	52.2 <sup>b</sup>	45.5 <sup>b</sup>
A. <i>veronii</i> (ESV-393)		Skin lesion	8.8 <sup>b</sup>	45.5 <sup>b</sup>	44.4 <sup>b</sup>
Uninfected control group			0.0 <sup>a</sup>	17.7 <sup>a</sup>	0.0 <sup>a</sup>

Groups with different uppercase letters in the same column are significantly different ( $P < 0.05$ ).

**Figure 1.** Survival plots of rainbow trout infected with different *Aeromonas* species and uninfected, control group. Plots were calculated using the Kaplan-Meier test.



Work groups	Mean	median	IQR
<i>A. bestiarum</i>	0.91	1.00	0.00
<i>A. caviae</i>	0.96	1.00	0.00
<i>A. hydrophila</i>	0.87	1.00	0.00
<i>A. salmonicida</i>	0.82	1.00	0.00
<i>A. sobria</i>	0.98	1.00	0.00
<i>A. veronii</i>	0.91	1.00	0.00
<i>A. allosaccharophila</i> , <i>A. lusitana</i> , <i>A. media</i> , <i>A. popoffii</i> and uninfected group	1.00	1.00	0.00

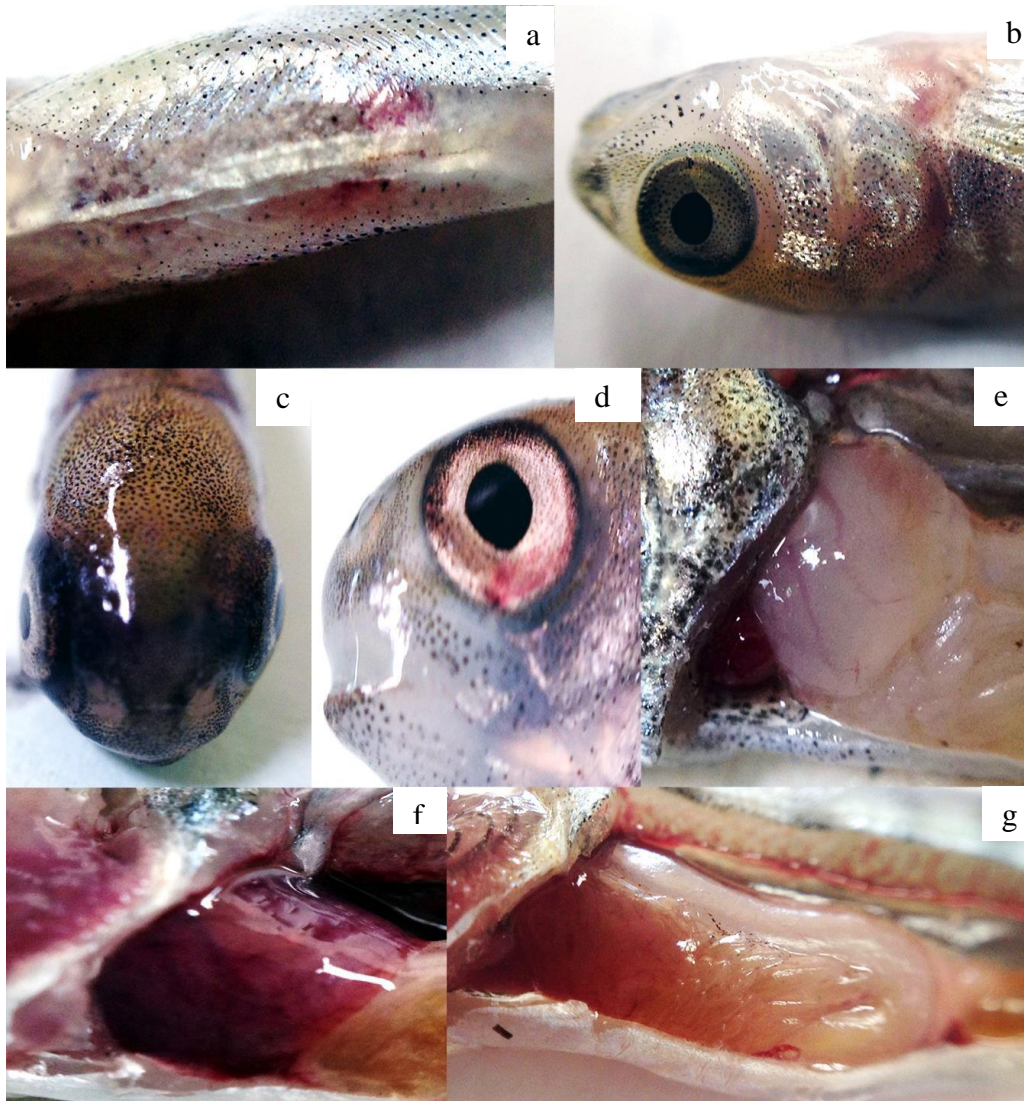


---

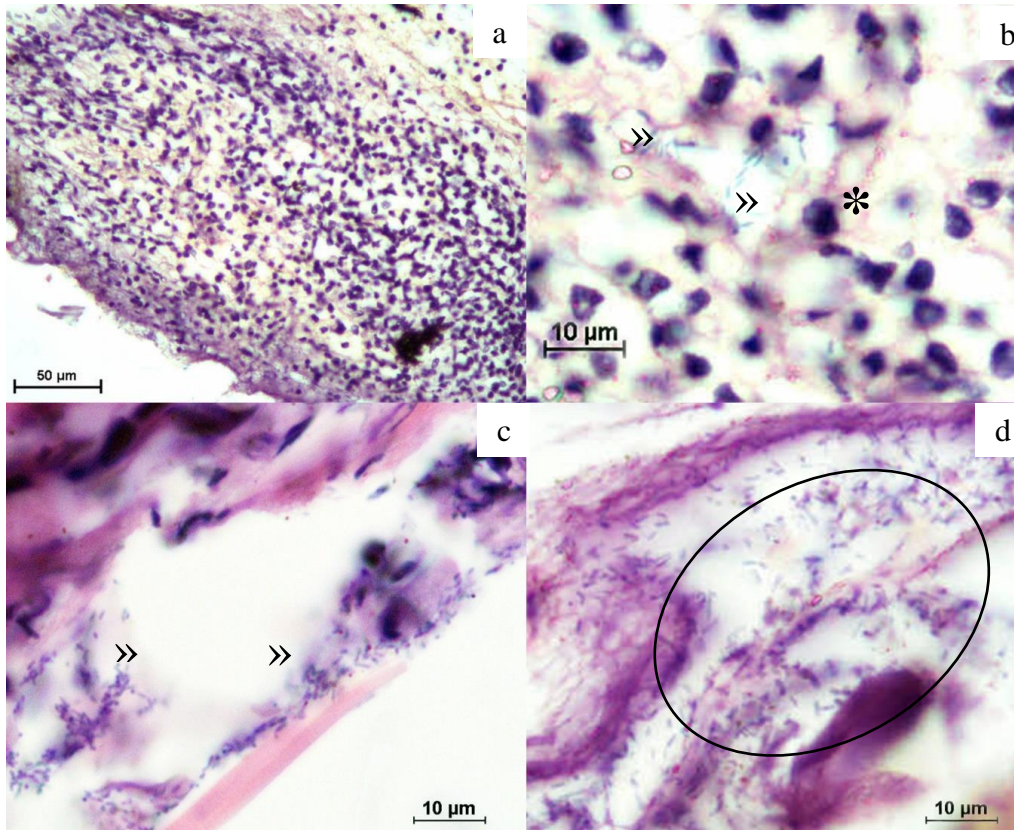
uninfected group

---

**Figure 2.** Macroscopic lesions in rainbow trout infected by immersion bath with different species of *Aeromonas*. (a) Congestion of the ventral surface near the anus and (b) mild petechial hemorrhages in the ventral part of the opercula in fish infected with *A. salmonicida*, 1 day pe. (c) Unilateral exophthalmia in fish infected with *A. hydrophila*, 1 day pe. (d) Mild ocular hemorrhages and (e) severe hepatic anemia in fish infected with *A. veronii*, at inoculation day. (f) Mild hepatic congestion in fish infected with *A. bestiarum*, at 7 days pe. (g) Uninfected, control fish.



**Figure 3.** Histological lesions observed in rainbow trout infected by immersion bath with *Aeromonas salmonicida*. (a) Infiltration of inflammatory cells in the ventral surface close to the anal fin. (b) Focal inflammatory area; infiltrate with mononuclear cells (\*) and a bacterial aggregate (>>). (c) Infiltration of inflammatory cells in the ventral surface close to the anal fin and bacterial aggregate (>>). (d) Intestine, bacteria in lamina propria and bacterial translocation (circle).



c) Artículo aceptado

### Revista electrónica AquaTIC



La Revista AquaTIC, es una revista electrónica internacional que abarca todos los temas relacionados con la acuicultura y es el portal más importante de acuicultura en castellano. Ofrece su contenido de forma gratuita a productores, investigadores y profesionales del medio.

CAB Abstracts: International Standard Serial Number (ISSN) 1578-4541.

Indexada en:

- Sistema Regional de Información en Línea para Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal (Latindex).
- Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal (Redalyc).
- Plataforma Open Access de Revistas Científicas Electrónicas Españolas y Lationamericanas (e-revist@s).
- Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

*Aeromonas* spp.: la infección en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y su aislamiento en México.

Zepeda-Velázquez, Andrea Paloma<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México.

Carretera Toluca-Atlacomulco km 15.5. Toluca 50200, México, México.

Teléfono: 722 2965555

\*Autor de correspondencia

Andrea Paloma Zepeda Velázquez.

Correo electrónico: [mvz.andreaz@gmail.com](mailto:mvz.andreaz@gmail.com)

## RESUMEN

El género *Aeromonas* incluye bacterias Gram negativas que se encuentran ampliamente distribuidas en ambientes acuáticos. Estos microorganismos afectan a una amplia variedad de especies animales, incluido el hombre. En acuicultura, diversas especies de *Aeromonas* infectan especies de cultivo y producen pérdidas económicas significativas. De manera particular, la producción de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) contribuye significativamente en la acuicultura de México. En este trabajo se revisa la patogenicidad de las especies de *Aeromonas* que infectan a la trucha arcoíris, así como los diversos factores que modifican esta interacción.

Palabras clave: *Aeromonas*, patogenicidad, trucha arcoíris, *Oncorhynchus mykiss*.

## ABSTRACT

The genus *Aeromonas* includes Gram-negative bacteria widely distributed in aquatic environments. These microorganisms infect a broad variety of animals, including humans. In aquaculture, several *Aeromonas* species infect cultured fish and produce significant economic losses. Particularly, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) production contributes significantly in the Mexican aquaculture and is potentially threatened by aeromonads. In the current work, the pathogenesis of the *Aeromonas* species that infect rainbow trout, and the several factors involved in this interaction, are reviewed.

Key words: *Aeromonas*, pathogenesis, rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*.

## INTRODUCCIÓN

El género *Aeromonas* es un grupo de bacterias de importancia para la acuicultura, ya que pueden actuar como agentes patógenos importantes en especies poiquilothermas, debido a que se encuentran ampliamente distribuidos en cuerpos de agua (Janda y Abbott 2010); sin embargo estos microorganismos también han sido considerados habitantes no patogénicos de animales acuáticos y terrestres (Huber *et al.*, 2004, Lehane y Rawlin 2000). Los peces no son los únicos infectados, pues estos microorganismo también han sido aislados de humanos con diversos cuadros clínicos, como son: infecciones cutáneas (Meik *et al.*, 2011), respiratorias (Cremonesini *et al.*, 2008). Incluso se han aislado de muestras de pescado congelado y otros alimentos (Yogananth *et al.*, 2009), así como de agua potable (Tequianes-Bravo *et al.*, 2005), lo que sugiere que esta bacteria es adaptable a diversos ambientes (Janda 1991).

Se han realizado diferentes estudios de éste género, de los cuales se ha obtenido información referente a la signología clínica, lesiones anatomopatológicas y lesiones histopatológicas, así como la obtención de aislamientos de infecciones naturales y el empleo de éstos para realizar infecciones experimentales en diferentes especies de peces (Gudmundsdóttir *et al.* 2003; LaPatra *et al.* 2010; Ping-Chung *et al.* 2010; Paniagua *et al.* 1990; Kozińska, 2007). Sin embargo, no existe un trabajo que unifique criterios de signología clínica, lesiones macroscópicas y microscópicas en la infección inducida por las especies del género *Aeromonas* que afectan a la trucha arcoíris, por lo que en el presente artículo hace una revisión bibliográfica de los diversos hallazgos clínicos, patológicos e histopatológicos, de brotes naturales así como los de infección experimental, reportados únicamente para en la trucha arcoíris, *Oncorhynchus mykiss*.

## **I. ETIOLOGÍA**

### **a) Taxonomía**

Este grupo de bacterias pertenece al género *Aeromonas*, familia *Aeromonadaceae*, orden *Aeromonadales* y clase *Gammaproteobacteria* (Castro-Escarpulli *et al.*, 2003). Actualmente el género incluye más de 30 especies (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2013; Martínez-Murcia *et al.*, 2013; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2015) (Tabla 1). Para su estudio, el género ha sido dividido en dos grandes grupos: un grupo mesófilico que se caracteriza por crecer entre 22 y 37 °C y que es conocido como el grupo de las especies móviles (que pueden poseer un flagelo lateral o peritrico), la presentación de la signología dentro de éste grupo es similar entre ellas, siendo la más frecuente *A. hydrophila*, capaz de causar alta mortalidad y provocar pérdidas económicas significativas (Noga, 2010). Asimismo para el caso de *A. media* que crece a 37.5 °C, sin embargo es una especie no móvil que causa infecciones clínicas en el hombre; y un grupo psicrófilo (crecen a temperaturas menores de 21 °C) que incluye la especie *A. salmonicida*; cabe destacar que esta especie se divide en dos grupos más, conocidos como cepas típicas que infectan a salmónidos y las cepas atípicas que están conformadas por 4 subespecies (Tabla 1) y se caracterizan por infectar a más de 50 especies de peces no salmónidos (Han *et al.* 2001). Tanto los grupos típicos como los atípicos pueden desarrollar la enfermedad conocida como furunculosis (Austin y Austin, 2010).

### **b) Identificación**

La etiología de la enfermedad ocasionada por miembros del género *Aeromonas* es complicada de establecer, debido a la diversidad genética, bioquímica y antigénica que existe en el grupo (Cipriano, 2001). Éste está conformado por bacterias Gram negativas, anaerobias facultativas, que presentan morfología poco variable (coco bacilar o bacilar pequeña) y miden aproximadamente



0.3–1.0 × 1.0–3.5 micras (µm), crecen en un amplio rango de temperaturas que van desde 0 a 45°C (Janda y Abbott, 2010). Debido a la versatilidad del género el crecimiento en medios nutritivos como el agar tripticasa de soya TSA (por sus siglas en inglés; trypticase soy agar) y agar base sangre adicionado con 10% de sangre de ovino (en el cual se hace evidente la presencia de hemólisis) son los medios de rutina utilizados para éste y otros géneros bacterianos poco exigentes. Asimismo existen medios selectivos que ayudan al aislamiento específico del género *Aeromonas*, como es el agar selectivo *Aeromonas Pseudomonas* según Kielwein (marca comercial Merck Millipore) adicionado con penicilina (las colonias de *Aeromonas* viran a color amarillo y las de *Pseudomonas* a color rojo-rosa), el agar ampicilina-dextrina (las colonias de *Aeromonas* viran a color amarillo) (Havelaar *et al.* 1987), entre otros. Algunas de las propiedades bioquímicas que muestran las bacterias del género *Aeromonas* son: catalasa positiva, productores de gas en glucosa y urea negativos; no obstante, se necesitan de un mínimo de 19 pruebas, entre bioquímicas y de susceptibilidad a distintos antimicrobianos para lograr la identificación de la mayoría de las especies (Castro-Escarpulli *et al.* 2003). *A. salmonicida* posee 4 subespecies que no comparten estas características bioquímicas y han sido catalogadas como atípicas, debido a la poca, leve o lenta presentación del pigmento café observada en el crecimiento de los aislamientos; reacción negativa en la prueba de catalasa, oxidasa negativa, nutricionalmente son fastidiosos y su crecimiento es lento (más de 5 días de incubación) (Austin y Austin, 2007; Buller, 2004). Algunas de las pruebas empleadas para la identificación generalizada del género se basan en la sensibilidad al agente vibriostático O/129 (2,4-diamino 6-7 diisopropilpteridina), crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl, crecimiento negativo en agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) e inositol negativo (Castro-Escarpulli *et al.* 2003). El empleo de marcadores moleculares permite la diferenciación genética, tales como: 16S rRNA, gyrB (subunidad B ADN gyrosa), rpoD (factor  $\sigma$ ), rpoB

(subunidad  $\beta$ , DNA dependiente de la RNA polimerasa) y la dnaJ (cabeza de proteína shock 40) (Janda y Abbott, 2010; Nhung *et al.*, 2007; Vásquez-Piñeros *et al.*, 2010), incluyendo el polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (por sus siglas en inglés; RFLP) (Borrell *et al.*, 1997).

### c) Virulencia

Se ha observado que la patogenicidad y grado de virulencia del género *Aeromonas* está influenciado por algunos factores ajenos al patógeno, que pueden ser causantes de una presentación clínica de la enfermedad, como son manejo inadecuado, pobre calidad y dureza del agua, altas temperaturas de los estanques, traumas o lesiones en la piel de los peces (Roberts, 2001). Asimismo la especie del pez infectado juega un papel importante, pues se ha observado que el salmón Báltico (*Salmo salar*) y la trucha arcoíris presentan cierta resistencia a la infección por *A. salmonicida*, siendo el salmón el más resistente (Holten-Andersen *et al.*, 2012); en contraste se ha observado que la trucha arcoíris es más resistente a la enfermedad que el salmón Atlántico (Roberts, 2001). Otros salmónidos como la trucha moteada (*Salvelinus fontinalis*) y la trucha café (*Salmo trutta*) son más susceptibles a la infección con este agente en comparación con la trucha arcoíris (Hoover *et al.*, 1998). Las manifestaciones clínicas ocasionadas por *Aeromonas* spp. sugieren que pueden ser causadas por una complicada red de factores de virulencia múltiples, ya que se ha visto que la virulencia de este género depende de la cepa bacteriana, ruta de infección y del modelo animal en el que se pretenda desarrollar la lesión (Yu *et al.*, 2005). Las *Aeromonas* móviles se han considerado como patógenos débiles; sin embargo la patogenia puede variar, como en el caso de *A. salmonicida*, que es un patógeno capaz de sobrevivir y replicarse *in vitro* con macrófagos (Garduño y Kay, 1992) permitiéndole evadir la respuesta inmune, así como la presencia de ciertos factores de virulencia

que juegan un rol importante en la adhesión de la bacteria a las células epiteliales del hospedero (Turska-Szewczuk *et al.* 2011, Dallaire-Dufresne *et al.* 2013). Otros factores como la presencia del pili tipo IV, que cumple funciones de motilidad, adherencia y colonización en el epitelio, ha demostrado ser un factor requerido para la virulencia de *A. salmonicida* (Tomás, 2012).

Se ha documentado que cepas de *A. hydrophila* aisladas de trucha arcoíris son más sensibles a los antibióticos en comparación con los aislamientos obtenidos del medio ambiente, pues éstos poseen resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, lo que sugiere que el medio ambiente puede ser un reservorio de bacterias resistentes a los antibióticos empleados para el tratamiento de casos clínicos (Saavedra *et al.*, 2004). Además, los cambios morfológicos en la estructura de la bacteria por la prolongada supervivencia en agua de río pueden provocar la pérdida o alteración de los factores de virulencia como es la presencia de la capa S (*layer-S*) (Paniagua *et al.*, 1990). El rápido desarrollo de herramientas moleculares ha permitido secuenciar completamente el genoma de 5 especies de *Aeromonas*, lo que es de gran utilidad debido a que permite analizar la diversidad que existe en el género en cuanto a los factores de virulencia. Se han identificado genes para la producción de polisacáridos de superficie (cápsula, LPS y glucanos), exotoxinas y enzimas extracelulares, sistemas de secreción, fimbrias y otras adhesinas no filamentosas; y flagelos (Tomás, 2012), así como de aerolisinas y nucleasas (Nam y Joh, 2007). Algunos elementos estructurales de la bacteria pueden ser empleados para el desarrollo de vacunas. Lutwyche y colaboradores (1995) demostraron que la inoculación de la porina por vía intraperitoneal ocasiono un incremento u significativo de protección en los peces desafiados. Estudios similares han demostrado el empleo de factores de virulencia para generar una respuesta inmune contra *Aeromonas* (Merino *et al.* 2005, Marsden *et al.* 1996).

## II. EPIDEMIOLOGÍA

### a) Ecología y rango de hospedadores

La distribución del género incluye cuerpos de agua limpia y contaminada, así como sistemas marinos sin extrema salinidad y lodazales, además de formar parte de la flora intestinal de peces sanos (Austin y Austin, 2007). Estos microorganismos cuentan con una amplia variedad de hospederos que incluyen diferentes especies poiquiloterms: tilapia (*Oreochromis sp Orinoquia*) (Vásquez-Piñeros *et al.*, 2010), carpa común (*Cyprinus carpio*) (Kozínska *et al.*, 2002), bagre (*Ictalurus punctatus*) (Nawaz *et al.*, 2006), anguila común (*Anguilla anguilla*) (Austin *et al.*, 1998), pez dorado (*Carassius auratus*) (Rahman *et al.*, 2001), carpa Koi (*Cyprinus carpio koi*) (Cízek *et al.* 2010), lenguado (*Solea solea*) (Pérez *et al.* 1996), salmón atlántico (*Salmo salar*) (Holten-Andersen *et al.*, 2012), trucha arcoíris (Fuentes y Pérez, 1998), pez roca negro (*Sebastes schlegeli*) (Han *et al.*, 2001), cocodrilos (*Crocodylus niloticus*) (Turutoglu *et al.*, 2005), rana (*Rana tigerina* y *R. rugulosa*) (Pearson *et al.*, 2000); y en el mamífero lobo marino (*Otaria flavescens*) (González *et al.*, 2009); especies terrestres como: cerdo, pollos, perros, gatos y humanos (Paniagua *et al.*, 1990); incluso ha sido aislado de alimentos como pescado congelado (Castro-Escarpulli *et al.*, 2003), verduras, leche, carne de bovino y embutidos (Janda y Abbott, 2010). La importancia de este microorganismo en la salud pública radica en su poder zoonótico. En humanos producen diarrea (Guevara *et al.*, 2002), infecciones cutáneas (Meik *et al.*, 2011), infecciones oculares (presencia de úlceras en la córnea) (Puri *et al.* 2003), bacteremia (Chih-Cheng *et al.*, 2007), mortalidad de pacientes inmunocomprometidos (Yang *et al.*, 2008), artritis, entre otras (Isoken *et al.*, 2012).

## **b) Transmisión**

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad pueden variar dependiendo de la edad y la especie de los peces infectados, la cepa bacteriana implicada y las condiciones ambientales (Brown, 2000). Los peces infectados con el grupo de *Aeromonas* móviles, generalmente muestran cuadros subclínicos, clínicos y en ocasiones crónicos (John *et al.*, 2011), mientras que el grupo no móvil, tiende a presentar cuadros subagudos caracterizados por la presencia de furúnculos en la superficie del pez infectado, en cuadros crónicos se observa la etapa final de la evolución del furúnculo, observándose una lesión dérmica caracterizada por la inflamación del músculo y piel adyacentes al sitio de lesión, en casos severos se ha observado que la lesión puede alcanzar la cavidad celómica del pez infectado (Austin y Austin, 2007). La transmisión horizontal de ambos grupos es causada por la exposición de un pez inmunocomprometido con uno infectado o por la diseminación del agente al medio ambiente, por medio de las excretas y la sobrevivencia en el material orgánico; y como ocurre en el caso de *A. salmonicida*, la laceración de la piel en donde se desarrolló el furúnculo contamina el medio acuático con sangre, tejido necrótico y bacterias, siendo éste el mayor foco de infección durante los brotes (Dallaire-Duresne *et al.*, 2013).

Sin embargo, el aislamiento del género *Aeromonas* a partir de branquias e intestino es común debido a la exposición al ambiente acuático (Inglis *et al.*, 1993). En un estudio realizado por Rahman y colaboradores (2007), se mostró que la vegetación en plantas tratadoras de agua residuales puede servir como reservorio de *Aeromonas* spp., por lo que el empleo de agua reciclada para la acuicultura posee un alto grado de riesgo para la explotación de especies acuáticas así como para la salud pública.

### III.SIGNOLOGÍA Y PATOGENIA

Cabe destacar que la descripción para la signología y patogenia para el grupo de las *Aeromonas* móviles es ejemplificada por *A. hydrophila*, ya que la descripción de la enfermedad es similar entre las especies móviles (Austin y Austin, 2007). Por ello, la infección en peces causada por este grupo es conocida de manera general como septicemia por *Aeromonas* móviles (Noga, 2010), la signología no es específica, los animales que son afectados presentan una morbilidad del 80% y mortalidades acumuladas aproximadas de 50% (Fuentes y Pérez, 1998). Esta se caracteriza por lesiones en la dermis con características morfológicas diferentes (úlceras, erosiones y hemorragias), de localización (focal y multifocal) que pueden encontrarse en las zonas (craneal, caudal, dorsal, ventral y lateral); asimismo como de profundidad (afección a la epidermis, músculo o hasta cavidad abdominal), así como la presencia lesiones en aletas dorsales, caudales, ventral, pectorales y anal (Noga, 2010, Inglis *et al.*, 1993). Las hemorragias causadas por las hemolisinas pueden ocasionar procesos septicémicos, los hallazgos macroscópicos identificados en los peces incluyen: exoftalmia, ulceración ocular, hidropesía con presencia de fluido sanguinolento, confiriendo al abdomen la forma de tabla escalonada (Cipriano, 2001), anorexia, oscurecimiento generalizado de la piel, prolapso rectal (Noga, 2010), presencia de petequias, necrosis y/o putrefacción de las aletas dorsales y caudales, sin presentar necesariamente lesiones en la piel (Nam y Joh, 2007); presencia de necrosis y hemorragia en la base de las aletas (Saavedra *et al.*, 2004).

Para el caso de *A. salmonicida*, que es el agente etiológico de la enfermedad conocida como furunculosis y es considerado un agente patógeno primario, se ha aislado de una amplia variedad de salmónidos y no salmónidos (Wiklund *et al.*, 1998). Este agente es introducido a las granjas usualmente por animales sanos o animales recuperados de la enfermedad, que fungen como

reservorios, liberando el agente al medio y predisponiendo a la población susceptible a un brote (Allejo y Ellis, 1989). La tasa de morbilidad en peces estresados representa el 90% (John *et al.*, 2011), mientras que la mortalidad en peces infectados puede provocar mortalidades que oscilan de 0 a 100% (Kozíńska, 2007). Por ello, este agente patógeno debe ser considerado como uno de los primeros sospechosos que provocan pérdidas económicas en granjas de peces (Kozíńska *et al.*, 2002; Kırkan *et al.*, 2003). Los brotes de enfermedad tienen un impacto económico negativo para la acuicultura (Turska-Szewczuk *et al.*, 2011).

*A. salmonicida* puede sobrevivir afuera del hospedero, dependiendo de las condiciones presentes en el agua (Hiney *et al.*, 1997). Todas las edades son susceptibles a presentar la enfermedad, aunque los peces jóvenes son afectados en menor frecuencia, pero cuando son afectados saltan fuera del estanque, la piel puede presentar un oscurecimiento fuera de lo normal y mueren (Austin y Austin, 2007). Sin embargo, los animales enfermos pueden llegar a recuperarse, incluso cuando la lesión se localiza en músculo esquelético (Hiney *et al.*, 1997). Los signos clínicos de la enfermedad dependen del tiempo y curso de la infección, los casos hiperagudos se presentan generalmente en crías de salmónidos que presentan muerte súbita (Noga, 2010). En animales de mayor edad el desarrollo clínico patológico agudo, se presenta con una septicemia hemorrágica que puede generarse sin la presentación de lesiones forunculosis en la piel. En casos donde el furúnculo logra desarrollarse, la ulceración y erosión de éste permite la secreción de fluido sanguinolento en el agua diseminando el patógeno (Inglis *et al.*, 1993).

En los casos crónicos el progreso de la infección es lento y resulta en una localización generalizada del agente en las vísceras, afectando comúnmente branquias, hígado, riñón, bazo, intestino y células epiteliales de los vasos sanguíneos (Inglis *et al.*, 1993). También es común la presentación de letargia, inapetencia, petequias e hinchazón en la base de las aletas, que puede

transformarse en una úlcera severa; adicionalmente, se ha observado exoftalmia y secreción sanguinolenta en narinas (Noga, 2010; Austin y Austin, 2007).

#### **a) Lesiones macroscópicas**

Para el caso de las *Aeromonas* móviles, en la necropsia se han observado branquias hemorrágicas, congestión en órganos internos; de manera similar el riñón puede presentar hemorragias (Fuentes y Pérez ,1998); bazo y riñón pueden encontrarse tumefactos, originando la salida de líquido; además se han observado petequias en vísceras abdominales e hinchazón del intestino (Inglis *et al.*, 1993). En la infección experimental con *A. hydrophila* biovariedad *dhakensis* (actualmente *A. dhakensis*), inoculada por vía intramuscular (IM) en trucha arcoíris, se observó septicemia hemorrágica generalizada con presencia de lesiones tipo furunculosas alrededor del sitio de inyección, así como lesiones hemorrágicas en cabeza, ojos y branquias (Kozínska *et al.*, 2007).

En peces infectados con *A. salmonicida* se observa la presencia de hemorragias en la base de las aletas y en las branquias, además de la presencia de úlceras (Kinkelin *et al.*, 1991). La presentación crónica de la enfermedad se observa generalmente en peces de mayor edad y la presentación cutánea se hace evidente por la presencia de furúnculos, que dependiendo de la severidad de la infección puede extenderse hasta cavidad abdominal, provocando una infección sistémica (Noga, 2010). En intestino se han observado lesiones hemorrágicas y necróticas, los animales por lo general dejan de comer y el contenido del intestino está constituido por moco y sangre (Mulder *et al.*, 2007). En corazón, se ha observado infiltración de fluido en pericardio, además de una coloración rojo cereza del bazo y color gris en hígado (Inglis *et al.*, 1993).



## **b) Hallazgos histológicos**

En la histopatología de la septicemia causada por las *Aeromonas* móviles se observa depleción hematopoyética, necrosis de células renales y esplénicas, necrosis en el lumen y la membrana mucosa del intestino, además de observarse necrosis focal presente en tejido cardiaco, hígado, gónadas y páncreas; en encéfalo se ha observado congestión leptomeníngea (Cipriano, 2001); de manera similar en hígado se ha observado hepatitis multifocal no supurativa y colangiohepatitis (Saavedra *et al.*, 2004). En la dermis se ha observado edema severo, hiperemia del estrato reticular, ulceración y necrosis hemorrágica, que puede extenderse hasta músculo esquelético en casos severos (Rey *et al.*, 2009). En piel y músculo se ha observado dermatitis y miositis aguda-crónica, con presencia de infiltrado inflamatorio conformado por neutrófilos, principalmente (Saavedra *et al.*, 2004). En ojos se ha observado trombosis e inflamación en la región periesclerótica así como en el epitelio corneal. En casos donde los peces se recuperan de la infección, la presencia de úlceras en la dermis es seguida de la regeneración del tejido y la eliminación del patógeno (Fuentes y Pérez, 1998).

Aislamientos obtenidos de truchas arcoíris clínicamente sanas, de diferentes especies de *Aeromonas* (*A. bestiarum* y *A. veronii*) empleadas para desafiar truchas sanas, son capaces de provocar mortalidad y signología, manifestadas en diferentes niveles de virulencia en donde las lesiones se manifestaron por úlceras y necrosis en casos crónicos y subagudos, distensión abdominal, anemia y hemorragias en tejidos internos (Kozínska, 2007). Otras diferentes rutas de infección experimental incluyen la inoculación intraperitoneal (IP) con aislamientos de *A. hydrophila* obtenidos de sedimentos de agua de río, las cuales provocaron lesiones hemorrágicas en la pared abdominal interna, palidez en hígado y ascitis (Paniagua *et al.*, 1990). De manera similar, un estudio realizado por Nya y Austin (2010) en donde se inyectaron por vía IP lipopolisacáridos

(LPS) obtenidos de un aislamiento de *A. hydrophila* de un barramundi (*Lates calcarifer*) para desafiar a truchas arcoíris, no provocaron signología durante el periodo de infección; sin embargo, se presentó una mortalidad del 45%, observada en la mitad del periodo del experimento y un incremento en las células inmunológicas.

Sin embargo, los hallazgos histopatológicos en la epidermis de peces infectados con *A. salmonicida* se incluye la presencia agregados basófilos (colonias bacterianas) localizados de manera focal o multifocal, con o sin presencia de infiltrados de macrófagos, así como la presencia de focos de necrosis licuefactiva al centro de las lesiones, presente de manera similar en tejido conectivo del riñón (Inglis, 1993).

En la superficie del intestino se observan petequias y en tejido cardiaco se ha observado necrosis cardíaca tóxica especialmente en los atrios, así como la localización focal de agregados basófilos y una marcada depleción linfocitaria en riñón y bazo; además de observarse la desgranulación de eosinófilos en la mucosa del intestino, que puede extenderse y presentarse en menor grado en las branquias (Hiney *et al.*, 1997, Powell *et al.*, 1991). Un estudio realizado por Jutfelt y colaboradores (Jutfelt *et al.*, 2006) demostró que *A. salmonicida* emplea la translocación desde el epitelio intestinal a diversos órganos, siendo esta una ruta de infección eficiente en hospederos inmunodeprimidos.

#### **IV. PRESENCIA DE *Aeromonas* spp. EN MÉXICO**

Los estudios que se han realizado en México informan el aislamiento de diferentes especies de *Aeromonas*, tal es el caso de *A. hydrophila* aislado de charales (*Chirostoma humboldtianum*, Valenciennes, 1835) para consumo humano (Paniagua *et al.*, 2006); otras especies como *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. veronii* biovariedad *veronii* y *A. encheleia* han sido

aisladas de tilapias (*Oreochromis niloticus*) congeladas en un mercado de la ciudad de México (Castro-Escarpulli *et al.*, 2003); asimismo un reporte de un caso de una granja de trucha arcoíris localizada en el Estado de México, presentó septicemia hemorrágica con morbilidad de 80% y mortalidad de 51.2%, el aislamiento bacteriológico demostró que *A. hydrophila* era el agente causal (Fuentes y Pérez, 1998), un estudio patológico en trucha arcoíris y tilapia (*Oreochromis aureus*, L.) que presentaban cogestión marcada y la infestación de *Ichthyophthirius multifiliis* en branquias, reportó el aislamiento de *A. hydrophila*, así como de tejidos internos (hígado, riñón, bazo) (Constantino *et al.*, 1997), el aislamiento de *A. bestiarum* a partir de carpa común (*Cyprinus carpio* L.) (Soriano-Vargas *et al.*, 2010), asimismo se han identificado las especies de *A. salmonicida*, *A. hydrophila* y *A. veronii* de diferentes truchas arcoíris que presentaron lesiones en la dermis (Zepeda-Velázquez *et al.*, 2015).

En un estudio realizado por Salgado-Miranda y colaboradores (2010), se obtuvieron aislamientos de *Aeromonas* obtenidas a partir de truchas arcoíris, provenientes de diversas granjas de México, empleando bioquímicas se identificaron 2 especies: *A. hydrophila*, *A. salmonicida* y un porcentaje de aislamientos permanecieron como *Aeromonas* spp., el en 48.78 % de los aislamientos obtenidos fueron *Aeromonas*. Recientemente se identificaron 10 especies de *Aeromonas* aisladas de trucha arcoíris provenientes de diferentes granjas de México, siendo *A. veronii* biovar *sobria*, *A. hydrophila* y *A. bestiarum* las especies más predominantes (Vega-Sánchez *et al.*, 2014a), las cuales se identificó que el 39.6% poseían uno o más genes que codifican para la presencia de  $\beta$ -lactamasas, metalo-beta- lactamasas e integrones clase 1 (Vega-Sánchez *et al.*, 2014b). *A. salmonicida* es considerada en la truticultura como la principal bacteria no móvil patógena dentro de este género y puede ocasionar hasta 100% de mortalidad (Roberts, 2001).

La producción de trucha en México es una actividad de gran importancia debido a su alta demanda como fuente de proteínas, datos publicados en el mes de mayo del 2015 en un comunicado de prensa; la producción nacional pesquera y acuícola del 2014 ascendió a un millón 751 mil 952 toneladas, obteniéndose un 32.2 % de incremento del año 2013 al año 2014; siendo la mojarra, trucha y el ostión las que destacan (SAGARPA, 2015). A finales del 2014 la producción de trucha arcoíris genero 527,247.11 kilos de peso vivo, con un equivalente de 28, 582, 065.83 pesos en el estado de México (CONAPESCA, 2015). La producción de ésta especie se localiza principalmente en los estados de: México, Puebla, Michoacán, Hidalgo, Chihuahua, Veracruz (SAGARPA, 2011), por lo que la presencia de este género en la truticultura debe ser considerada como una amenaza.

## V. DIAGNÓSTICO

El diagnostico general patógeno consiste en el aislamiento y purificación de las colonias bacterianas, así como la identificación por medio de los métodos anteriormente mencionados (Castro-Escarpulli *et al.*, 2003). Pruebas complementarias permiten tener la certeza de que las bacterias pertenecen al género, como es la prueba de la DNAsa que en el caso de *Aeromonas* spp., da una reacción positiva gracias a la presencia de la enzima desoxirribonucleasa, además resulta de gran ayuda sembrar las colonias en agar *Pseudomonas* adicionado con 10 % de glicerol (marca comercial, BD Difco), en donde las colonias de *Aeromonas* no presentan fluorescencia al ser expuesta a luz ultravioleta (Noga ,2010). Sin embargo, para ahorrar tiempo y material puede emplearse el sistema comercial Api 20E, que permite la identificación de algunas especies de *Aeromonas*, para una correcta identificación de la especie es recomendado emplear pruebas moleculares (Vega-Sánchez *et al.*, 2014b)

## **VI. CONTROL Y TRATAMIENTO**

El control para el manejo de brotes consiste en la eliminación de peces moribundos y de aquellos con signología clínica de la enfermedad, estabilizar los parámetros del agua: baja salinidad, estabilizar la temperatura a no más de los 17 °C, niveles adecuados de pH, procurar una oxigenación mínima de 5.5 partes por millón (ppm), conservar los niveles de amonio inferiores a 0.015 ppm y reducir los contaminantes orgánicos. En el caso de *Aeromonas* móviles la aplicación de antibióticos no es recomendado debido a que la enfermedad es auto limitante en los casos crónicos, si la enfermedad tiene una presentación severa con altos porcentajes de mortalidad y reducción en el consumo de alimento, si es recomendada la administración de sulfonamidas potenciadas (Noga, 2010; Blanco, 1995). Aunque el uso de antimicrobianos han sido de gran utilidad para el control de esta enfermedad y muchos otros agentes patógenos, el empleo de antimicrobianos se ve afectado por dos razones importantes: la resistencia a diversos antibióticos que puede exacerbar la presentación clínica de la enfermedad y los altos costos de la aplicación de los fármacos (Kirkan *et al.*, 2003; Blanco, 1995).

## **VII. CONSIDERACIONES FINALES**

La mayoría de las lesiones descritas en el presente trabajo de revisión son generalmente encontradas tanto en los reportes de brotes naturales así como de infecciones experimentales, con ciertos cambios en la severidad y localización de las lesiones. Los problemas de manejo en las truchas y otras especies de peces, como son hacinamiento, jerarquía, contaminación del agua, hipoxia, cambios de pH, incluso las fluctuaciones de temperatura juegan un papel importante en la presentación de ciertas especies de *Aeromonas*, favoreciendo la concentración del microorganismo solo en ciertas temporadas (Lee *et al.*, 2002). En los teleósteos es importante que el tejido asociado

a mucosa, conformado por branquias, piel e intestino se encuentre íntegro, ya que estos conforman la barrera inicial para evitar la entrada de agentes patógenos (Rubio-Godoy, 2010) y a su vez el moco (que posee enzimas bactericidas como la lisozima e inmunoglobulinas) sea secretado reduciendo la habilidad de la bacteria para adherirse a las células epiteliales y evitar su ingreso al torrente sanguíneo (Dalmo *et al.*, 1997).

La signología descrita no es exclusiva de la infección por *Aeromonas* spp., ya que comparte algunos signos con otras enfermedades. Un manejo adecuado y medidas de prevención adecuadas (vacunación, eliminación de peces enfermos y moribundos, limpieza de los estanques, mantenimiento de temperaturas estables y estudios bacteriológicos, entre otros) para cada granja en cuestión, pueden ser de gran ayuda para evitar brotes de enfermedades bacterianas y en consecuencia morbilidad y mortalidades elevadas que repercuten en pérdidas monetarias. Sin embargo, la presentación de signología inespecífica en una explotación trutícola, es una señal de atención para revisar y ajustar parámetros productivos con respecto a la calidad del medio acuático en la explotación con el fin de evitar estrés en los peces.

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), proyecto CB-2008-01-103142 (registro UAEM 1900/2010C). La autora agradece el apoyo y valiosos comentarios del Dr. Miguel Rubio Godoy, del Instituto de Ecología A.C (INECOL) y del Dr. Edgardo Soriano Vargas de la Universidad Autónoma del Estado de México, en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA).

## REFERENCIAS

1. Allejo AN, Ellis AE. Ultra structural study of the response of eosinophil granule cells to *Aeromonas salmonicida* extracellular product and histamine liberations in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. Dev Comp Immunol. 1989; 13:133-148.
2. Alperi A, Martínez-Murcia AJ, Ko WC, Monera A, Saavedra MJ, Figueras MJ. *Aeromonas taiwanensis* sp. nov. and *Aeromonas sanarellii* sp. nov., two new clinical species from Taiwan. Int J Syst Evol Microbiol. 2010a; 60: 2048-2055.
3. Alperi A, Martínez-Murcia AJ, Monera A, Saavedra MJ, Figueras MJ. *Aeromonas fluvialis* sp. nov., isolated from a Spanish river. Int J Syst Evol Microbiol. 2010b; 60: 72-77.
4. Aravena-Román M, Beaz-Hidalgo R, Inglis TJ, Riley TV, Martínez-Murcia AJ, Chang BJ, Figueras MJ. *Aeromonas australiensis* sp. nov., isolated from irrigation water. Int J Syst Evol Microbiol. 2013; 63: 2270-2276.
5. Austin B, Austin DA. Bacterial fish pathogens, diseases of farmed and wild fish. 4ta. Chichester, UK: Praxis Publishing Ltd, 2007:81-99.
6. Austin B, Austin DA, Dalsgaard I, Gudmundsdóttir BK, Høie S, Thornton JM, Larsen JL, O'Hici B, Powell R. Characterization of atypical *Aeromonas salmonicida* by different methods. Syst Appl Microbiol. 1998; 21:50-64.
7. Beaz-Hidalgo R, Alperi A, Figueras MJ, Romalde JL. *Aeromonas piscicola* sp. nov., isolated from diseased fish. Syst Appl Microbiol. 2009; 32: 471-479.
8. Beaz-Hidalgo R, Latif-Eugenín F, Hossain MJ, Berg K, Niemi RM, Rapala J, Lyra C, Liles MR, Figueras MJ. *Aeromonas aquatica* sp. nov., *Aeromonas finlandiensis* sp. nov. and

- Aeromonas lacus* sp. nov. isolated from Finnish waters associated with cyanobacterial blooms. Syst Appl Microbiol. 2015; 38: 161-168.
9. Beaz-Hidalgo R, Martínez-Murcia A, Figueras MJ. Reclassification of *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* Huys et al. 2002 and *Aeromonas aquariorum* Martínez-Murcia et al. 2008 as *Aeromonas dhakensis* sp. nov. comb. nov. and emendation of the species *Aeromonas hydrophila*. Syst Appl Microbiol. 2013; 36:171-176.
  10. Borrell N, Acinas SG, Figueras MJ, Martínez-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.
  11. Brown L. Acuicultura para veterinarios. Producción y clínica de peces. España. Acribia S.A. 2000:139-148.
  12. Buller NB. Bacteria from fish and other aquatic animals, a practical identification manual. USA: CABI publishing, 2004:75-77.
  13. Carnahan AM, Chakraborty T, Fanning GR, Verma D, Ali A, Janda JM, Joseph SW. *Aeromonas trota* sp. nov., an ampicillin-susceptible species isolated from clinical specimens. J Clin Microbiol. 1991; 29: 1206-1210.
  14. Castro-Escarpulli G, Aguilera-Arreola MG, Hernández-Rodríguez CH, Arteaga-Caribay NI, Carmona-Martínez AA, Pérez-Valdespino A. La identificación genética de *Aeromonas* una realidad y una necesidad en la microbiología diagnóstica. Bioquímica. 2003; 28:11-18.
  15. Castro-Escarpulli G, Figueras MJ, Aguilera-Arreola G, Soler L, Fernández-Rendón E, Aparicio GO, Guarro J, Chacón MR. Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in México. Int J Food Microbiol. 2003; 84:41-49.



16. Chih-Cheng L, Chi-Chang S, Gin-Der L, Liang-Wen D. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* bacteremia: rare pathogens of infection in burn patient. *Burns*. 2007; 33:255-257.
17. Cipriano RC. *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. *Fish Dis Leaflet*. 2001; 68:1-25.
18. Cízek A, Dolejská M, Sochorová R, Strachotová K, Piacková V, Veselý T. Antimicrobial resistance and its genetic determinants in aeromonads isolated in ornamental (koi) carp (*Cyprinus carpio koi*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Vet Microbiol*. 2010; 142:435-439.
19. Constantino CF, Armijo OA, Osorio SD, Chávez SLA. Infección por *Aeromonas hydrophila* e *Ichthyophthirius miltifiliis* en trucha y tilapia de un centro de acopio de Morelos, México. Estudio patológico. *Vet Méx*. 1997; 28:59-62.
20. Cremonesini D, Thomson A. Lung colonization with *Aeromonas hydrophila* in cystic fibrosis believed to have come from a tropical fish tank. *J R Soc Med*. 2008; 101:S44-45.
21. Dallaire-Dufresne S, Tanaka KH, Trudel MV, Lafaille A, Charette SJ. Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis. *Vet Microbiol*. 2013; 8S0378-1135:00340-00344.
22. Dalmo RA, Ingebrigtsen K, Bøgwald J. Non-specific defense mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *J Fish Dis*. 1997; 20:241-273.
23. Demarta A, Küpfer M, Riegel P, Harf-Monteil C, Tonolla M, Peduzzi R, Monera A, Saavedra MJ, Martínez-Murcia A. *Aeromonas tecta* sp. nov., isolated from clinical and environmental sources. *Syst Appl Microbiol*. 2008; 31: 278-286.

24. Figueras MJ, Alperi A, Beaz-Hidalgo R, Stackebrandt E, Brambilla E, Monera A, Martínez-Murcia AJ. *Aeromonas rivuli* sp. nov., isolated from the upstream region of a karst water rivulet. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2011; 61: 242-248.
25. Fuentes RJM, Pérez HJA. Aislamiento de *Aeromonas hydrophila* en truchas Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet Méx.* 1998; 29:117-119.
26. Garduño RA y Kay WW. Interaction of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* whit rainbow trout macrophages. *Infect Immun.* 1992; 860:4612-4620.
27. González MJ, Villanueva MP, Latif F, Fernández F, Fernández H. Aislamiento de *Plesiomonas shigelloides* y *Aeromonas veronii* biotipo sobria en heces de lobo marino común sudamericano, *Otaria flavescens* (Shaw, 1800). *Rev Biol Mar Oceanogr.* 2009; 44:763-765.
28. Gudmundsdóttir S, Lange S, Magnadóttir B, Gudmundsóttir BK. Protection against atypical furunculosis in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.); comparison of a commercial furunculosis vaccine and autogenous vaccine. *J Fish Dis.* 2003; 26:331-338.
29. Guevara DJM, Huamaní C, Zerpa R, Valencia E, José MM, Guevara G, Anaya M. *Aeromonas* en la diarrea aguda de niños menores de 5 años. *An Fac Med.* 2002; 63:41-45.
30. Han H-J, Kim D-Y, Kim W-S, Jung S-J, Oh M-J, Kim D-H. Atypical *Aeromonas salmonicida* infection in the black rockfish, *Sebastes schlegeli* Hilgendorf, in Korea. *J Fish Dis.* 2011; 34:47-55.
31. Harf-Monteil C, Le Flèche A, Riegel P, Prévost G, Bermond D, Patrick AD, Monteil G, Monteil H. *Aeromonas simiae* sp. nov., isolated from monkey faeces. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004; 54: 481-485.

32. Havelaar AH, During M, Versteegh JF. Ampicillin-dextrin agar medium for the enumeration of *Aeromonas* species in water by membrane filtration. *J Appl Bacteriol.* 1987; 62: 279-287.
33. Hickman-Brenner FW, Fanning GR, Arduino MJ, Brenner DJ, Farmer JJ 3rd. *Aeromonas schubertii*, a new mannitol-negative species found in human clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 1988; 26: 1561-1564.
34. Hiney M, Smith P, Bernoth Eva- María. Covert *Aeromonas salmonicida* Infections. In: Anderson DP, Aoki T, Bernoth Eva- María, Ellis AE, editors. *Furunculosis*. United States of America: Academic Press Ltd, 1997:54-97.
35. Holten-Andersen L, Dalsgaard I, Buchmann K. Baltic salmon, *Salmo salar*, from Swedish river Lule älv is more resistant to furunculosis compared to rainbow trout. *PLoS One.* 2012; 7:e29571.
36. Hoover GJ, el-Mowafi A, Simko E, Kocal TE, Ferguson HW, Hayes MA. Plasma proteins of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) isolated by binding to lipopolysaccharide from *Aeromonas salmonicida*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 1998; 120:559-569.
37. Huber I, Spanggaard B, Appel KF, Rossen L, Nielsen T, Gram L. Phylogenetic analysis in situ identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *J Appl Microbiol.* 2004; 96:117-132.
38. Huys G, Kämpfer P, Altwegg M, Kersters I, Lamb A, Coopman R, Lüthy-Hottenstein J, Vancanneyt M, Janssen P, Kersters K. *Aeromonas popoffii* sp. nov., a mesophilic bacterium isolated from drinking water production plants and reservoirs. *Int J Syst Bacteriol.* 1997; 47: 1165-1171.
39. Inglis V, Roberts RJ, Bromage NR. *Bacterial Diseases of Fish*. NY, Toronto: Halsted Press Wiley, 1993:122-155.

40. Isoken H, Igbinsosa, Ehimario U, Igumbor, Farhad Aghdasi, *et al.* Emerging *Aeromonas* species infections and their significance in public health. *ScientificWorldJournal*. 2012; 2012:1-13.
41. Janda JM. Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. *Clin Microbiol Rev*. 1991; 4:397-410.
42. Janda JM, Abbott SL. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and Infection. *Clin Microbiol Rev*. 2010; 23:35-73.
43. John A, Hanson P, Hanson LA. Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. 3era ed. USA: Wiley- Blackwell. 2011; 293-300.
44. Jutfelt F, Olsen RE, Glette J, Ringø E, Sundell K. Translocation of viable *Aeromonas salmonicida* across the intestine of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Dis*. 2006; 29:255-262.
45. Kinkelin P, Michel CH, Ghittino P. Tratado de las enfermedades de los peces. Zaragoza, España. Acribia S.A. 1991:88-89.
46. Kırkan Ş, Göksoy EÖ, Kaya O. Isolation and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas salmonicida* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey hatchery farms. *J Vet Med*. 2003; B50:339-342.
47. Kozińska A, Figueras M J, Chacon M R, Soler L. Phenotypic characteristics and pathogenicity of *Aeromonas* genomospecies isolated from common carp (*Cyprinus carpio* L.). *J Appl Microbiol*. 2002; 93:1034-1041.
48. Kozińska A. Dominant pathogenic species of mesophilic *Aeromonads* isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. *J Fish Dis*. 2007; 30:293-301.

49. LaPatra SE, Plant KP, Alcorn S, Ostland V, Winton J. An experimental vaccine against *Aeromonas hydrophila* can induce protection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Dis.* 2010; 33:143-151.
50. Lee C, Cho JC, Lee SH, Lee DG, Kim SJ. Distribution of *Aeromonas* spp. as identified by 16S rDNA restriction fragment length polymorphism analysis in a trout farm. *J Appl Microbiol.* 2002; 93:976-985.
51. Lehane L, Rawlin G. Tropically acquired bacterial zoonoses from fish: A review. *Med J Aust.* 2000; 173:256-259.
52. Lutwyche P, Exner MM, Hancock RE, Trust TJ. A conserved *Aeromonas salmonicida* porin provides protective immunity to rainbow trout. *Infect Immun.* 1995; 63:3137-3142.
53. Marsden MJ, Vaughan LM, Foster TJ, Secombes CJ. A live (delta aroA) *Aeromonas salmonicida* vaccine for furunculosis preferentially stimulates T-cell responses relative to B-cell responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Infect. Immun.* 1996; 64:3863-3869.
54. Martínez-Murcia A, Beaz-Hidalgo R, Svec P, Saavedra MJ, Figueras MJ, Sedlacek I. *Aeromonas cavernicola* sp. nov., isolated from fresh water of a brook in a cavern. *Curr Microbiol.* 2013; 66:197-204.
55. Martínez-Murcia AJ, Esteve C, Garay E, Collins MD. *Aeromonas allosaccharophila* sp. nov., a new mesophilic member of the genus *Aeromonas*. *FEMS Microbiol Lett.* 1992; 70: 199-205.
56. Martínez-Murcia AJ, Saavedra MJ, Mota VR, Maier T, Stackebrandt E, Cousin S. *Aeromonas aquariorum* sp. nov., isolated from aquaria of ornamental fish. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2008; 58: 1169-1175.

57. Meik S, Tiscornia J, Arias M, Kien MaC, Pellerano G. Infección cutánea por *Aeromonas*. Med Cutan Iber Lat Am. 2011; 39:23-25.
58. Merino S, Vilches S, Canals R, Ramirez S, Tomás JM. A C1q-binding 40 kDa porin from *Aeromonas salmonicida*: Cloning, sequencing, role in serum susceptibility and fish immunoprotection. Microb Pathog. 2005; 38:227-237.
59. Miñana-Galbis D, Farfán M, Fusté MC, Lorén JG. *Aeromonas molluscorum* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. Int J Syst Evol Microbiol. 2004; 54: 2073- 2078.
60. Miñana-Galbis D, Farfán M, Gaspar L, Fusté J&, MC. Proposal to assign *Aeromonas diversa* sp. nov. as a novel species designation for *Aeromonas* group 501. Syst Appl Microbiol. 2010; 33; 15- 19.
61. Mulder IE, Wadsworth S, Secombes CJ. Cytokine expression in the intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during infection with *Aeromonas salmonicida*. Fish Shellfish Immunol. 2007; 23:747-759.
62. Nam IY, Joh KJ. Rapid detection of virulence factors of *Aeromonas* isolated from a trout farm by hexaplex-PCR. Rapid. J Microbiol. 2007; 45:297-304.
63. Nawaz M, Sung K, Khan AS, Khan AA, Steele R. Biochemical and molecular characterization of tetracycline-resistant *Aeromonas veronii* isolates from catfish. Appl Environ Microbiol. 2006; 72:6461-6466.
64. Nhung PH, Hata H, Ohkusu K, Noda M, Shah MM, Goto K, Ezaki T. Use of the novel phylogenetic marker dnaJ and DNA-DNA hybridization to clarify interrelationships within the genus *Aeromonas*. Int J Syst Evol Microbiol. 2007; 57:1232-1237.
65. Noga EJ. Fish Disease, Diagnosis and treatment. 2da ed. USA: Wiley- Blackwell, 2010:185-190.

66. Nya EJ, Austin B. Use of bacterial lipopolysaccharide (LPS) as an immunostimulant for the control of *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J Appl Microbiol. 2010; 108:686-694.
67. Paniagua C, Rivero O, Anguita J, Naharro G. Pathogenicity factors and virulence for rainbow trout (*Salmo gairdneri*) of motile *Aeromonas* spp. isolated from a river. J Clin Microbiol. 1990; 28:350-355.
68. Paniagua LG, Monroy E, Perches M, Negrete E, García O, Vaca S. Antibiotic and heavy metal resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from charal (*Chirostoma humboldtianum*, Valenciennes, 1835). Hidrobiológica. 2006; 16:75-79.
69. Pearson MD, Hirono I, Aoki T, Miranda R, Inglis V. Virulence properties of motile aeromonads isolated from farmed frogs *Rana tigerina* and *R. rugulosa*. Dis Aquat Organ. 2000; 40:185-193.
70. Pérez MJ, Fernández AIG, Rodríguez LA, Nieto TP. Differential susceptibility to furunculosis of turbot and rainbow trout and release of the furunculosis agent from furunculosis-affected fish. Dis Aquat Org. 1996; 26:133-137.
71. Ping-Chung L, Wen-hsiao C, Chih-ching T, Kuo-kau L. Purification of a toxic cysteine protease produced by pathogenic *Aeromonas hydrophila* isolated from rainbow trout. J Basic Microbiol. 2010; 50:538-547.
72. Popoff M, Véron M. A taxonomic study of the *Aeromonas hydrophila*-*Aeromonas punctata* group. J Gen Microbiol. 1976; 94: 11-22.
73. Powell MD, Wright GM, Burka JF. Degranulation of eosinophilic granule cells induced by capsaicin and substance P in the intestine of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Cell Tissue Res. 1991; 266:469-74.

74. Puri P, Bansal V, Dinakaran S, Kayarkar VV. *Aeromonas sobria* corneal ulcer. Eye. 2003; 17:104-105.
75. Rahman M, Huys G, Rahman M, Albert MJ, Kuhn I, Molby R. Persistence, transmission, and virulence characteristics of *Aeromonas* strains in a duckweed aquaculture-based hospital sewage water recycling plant in Bangladesh. Appl Environ Microbiol. 2007; 73:1444-1451.
76. Rahman MH, Suzuki S, Kawai K. The effect of temperature on *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish, *Carassius auratus*. J Appl Ichthyol. 2001; 17:282-285.
77. Rey A, Verjan N, Ferguson HW, Iregul C. Pathogenesis of *Aeromonas hydrophila* strain KJ99 infection and its extracellular products in two species of fish. Rec Vet. 2009; 164:493-499.
78. Roberts RJ. Fish Pathology. 3era ed. USA, Toronto: W.B. Saunders. 2001; 315-321.
79. Rubio-Godoy M. Inmunología de los peces óseos. Rev Mex Cienc Pecu. 2010; 1:47-57.
80. Saavedra MJ, Guedes-Novais S, Alves A, Rema P, Tação M, Correia A, Martínez-Murcia A. Resistance to beta-lactam antibiotics in *Aeromonas hydrophila* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Int Microbiol. 2004; 7:207-211.
81. SAGARPA. Crece producción y consumo de trucha en el país. Comunicado de prensa NUM.378/11, 2011 [Citado 08 octubre, 2015]. Disponible en: URL: <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines2/2011/julio/Documents/2011B379.pdf>
82. Salgado-Miranda C, Palomares E, Jurado M, Marín A, Vega F, Soriano-Vargas E. Isolation and distribution of bacterial flora in farmed rainbow trout from México. J Aquat Anim Health. 2010; 22:244-247.
83. Soriano-Vargas E, Castro-Escarpulli G, Aguilera-Arreola MG, Vega-Castillo F, Salgado-Miranda C. Aislamiento e identificación de *Aeromonas bestiarum* a partir de carpa común



- de cultivo (*Cyprinus carpio* L.) procedentes de Santa María de Chapa de Mota, Estado de México, México. Vet Méx. 2010; 41:111-115.
84. Tequianes-Bravo L, Pérez-González DA, González-Malvárez MM, Flores-Pimentel M, Marroquín-Segura R. Aislamiento de *Aeromonas* productoras de aerolisina y enterotoxina, en muestras de agua potable en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y otras dependencias de la Universidad Nacional Autónoma de México. Bioquímica. 2005; 30:23-29.
85. Tomás JM. The main *Aeromonas* pathogenic factors. ISRN Microbiology. 2012; ID 25261:1-22.
86. Turska-Szewczuk A, Guz L, Lindner B, Pietras H, Russa R, Holst O. Structural characterization of the O-specific polysaccharide from the lipopolysaccharide of the fish pathogen *Aeromonas bestiarum* strain P1S. Carbohydr Res. 2011; 346:815-821.
87. Turutoglu H, Ercelik S, Corlu M. *Aeromonas hydrophila*-associated skin lesions and septicemia in a Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*). JI S Afr vet Ass. 2005; 76:40-42.
88. Vásquez-Piñeros MA, Rondón-Barragán IS, Restrepo-Betancur LF, Eslava-Mocha PR. Estudio clínico y hematológico de una infección experimental con *Aeromonas hydrophila* y *Edwardsiella tarda* en tilapia, *Oreochromis* sp. Orinoquia. 2010; 14:33-44.
89. Vega-Sánchez V, Acosta-Dibarrat J, Vega-Castillo F, Castro-Escarpulli G, Aguilera-Arreola MG, Soriano-Vargas E. Phenotypical characteristics, genetic identification, and antimicrobial sensitivity of *Aeromonas* species isolated from farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Mexico. Acta Tropica. 2014a; 130:76-79.
90. Vega-Sánchez V, Latif-Eugenín F, Soriano-Vargas E, Beaz-Hidalgo R, Figueras MJ, Aguilera-Arreola MG, Castro-Escarpulli G. Re-identification of *Aeromonas* isolates from

- rainbow trout and incidence of class 1 integron and  $\beta$ -lactamase genes. *Vet Microbiol.* 2014b; 172: 528-533.
91. Wiklund T, Dalsgaard I. Occurrence and significance of atypical *Aeromonas salmonicida* in non-salmonid and salmonid fish species: a review. *Dis Aquat Org.* 1998; 32:49-69.
92. Yang X, Yang QQ, Guo QY, Yi CY, Mao HP, Lin JX, Jiang ZP, Yu XQ. *Aeromonas salmonicida* peritonitis after eating fish in a patient undergoing CAPD. *Perit Dial Int.* 2008; 28:316-317.
93. Yogananth N, Bhakayaraj R, Chanthuru A, Anbalagan T, Nila KM. Detection of virulence gene in *Aeromonas hydrophila* isolated from fish samples using PCR technique. *J Biotechnol.* 2009; 4:51-53.
94. Yu HB, Zhang YL, Yao F, Vilches S, Merino S, Tomás JM, Howard SP, Leung KY. Identification and characterization of putative virulence genes and gene clusters in *Aeromonas hydrophila* PPD134/91. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71:4469-4477.

**Cuadro 1.** Especies del género *Aeromonas*.

Género y especie	Cepa de referencia	Importancia clínica		Grupos de hibridación	Observaciones	Referencia
		Humano	Otros			
<i>A. allosaccharophila</i>	CECT4199		Anguilas	HG 15		Martínez-Murcia <i>et al.</i> , 1992.
<i>A. aquatica</i>	CECT 8025 <sup>T</sup>		Agua de lago			Beaz-Hidalgo <i>et al.</i> , 2015
<i>A. australiensis</i>	CECT 8023 <sup>T</sup>		Agua			Aravena-Román <i>et al.</i> , 2012.
<i>A. bestiarum</i>	CECT4227	+	Peces	HG 2	Rara vez infecta humanos	Janda y Abbott, 2010.
<i>A. bivalvium</i>	868E <sup>T</sup>		Molusco ( <i>Cardium</i> sp.)			Miñana-Galbis <i>et al.</i> , 2007.
<i>A. cavernícola</i>	CECT838	+	Peces Agua potable	HG 4	<i>A. punctata</i>	Janda y Abbott, 2010.
<i>A. caviae</i>	CECT 7862 <sup>T</sup>				Agua de una caverna	Martínez-Murcia <i>et al.</i> , 2013
<i>A. dhakensis</i>	MDC47 <sup>T</sup>		Agua y peces de ornato		Animales sanos	Martínez-Murcia <i>et al.</i> , 2008.
<i>A. diversa</i>	CECT4240			HG 13	Grupo entérico 501	Miñana-Galbis <i>et al.</i> , 2010.
<i>A. encheleia</i>	CECT4342			HG 11		Janda y Abbott, 2010.
<i>A. eucrenophila</i>	CECT4224			HG 6		Janda y Abbott, 2010.
<i>A. finlandiensis</i>	CECT 8028 <sup>T</sup>		Agua de lago			Beaz-Hidalgo <i>et al.</i> , 2015

<i>A. fluvialis</i>	CECT 7401 <sup>T</sup>		Agua de río			Alperi <i>et al.</i> , 2010b
<i>A. hydrophila</i> subespecies <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>anaerogenes</i></li> <li>• <i>decolorationis</i></li> <li>• <i>dhakensis</i></li> <li>• <i>hydrophila</i></li> <li>• <i>ranaei</i></li> </ul>	CECT839	+	Peces Anfibios Agua potable	HG 1		Popoff y Véron, 1976.
<i>A. jandaei</i>	CECT4228	+	Anguila	HG 9		Carnahan <i>et al.</i> , 1991.
<i>A. lactus</i>	CECT 8024 <sup>T</sup>		Agua de lago			Beaz-Hidalgo <i>et al.</i> , 2015
<i>A. lusitana</i>	CECT 7828 <sup>T</sup>				Agua termal	Martínez-Murcia <i>et al.</i> , 2011.
<i>A. media</i>	CECT4232	+	Peces marinos Agua potable	HG 5		Janda y Abbott, 2010.
<i>A. molluscorum</i>	868 <sup>T</sup>		Molusco			Miñana-Galbis <i>et al.</i> , 2004.
<i>A. piscícola</i>	S1.2 <sup>T</sup>		Pez enfermo ( <i>Salmo salar</i> )		Animales moribundos	Beaz-Hidalgo <i>et al.</i> , 2009.
<i>A. popoffii</i>	CECT4995	+		HG 17		Huys <i>et al.</i> , 1997.
<i>A. rivuli</i>	WB4.1-19 <sup>T</sup>		Agua de río		Sin hemólisis	Figueras <i>et al.</i> , 2011.
<i>A. sanarellii</i>	A2-67 <sup>T</sup>	+			Aislado de infección cutánea	Alperi <i>et al.</i> , 2010a.

<i>A. schubertii</i>	CECT4241	+		HG 12		Hickman-Brenner <i>et al.</i> , 1988.
<i>A. simiae</i>	IBS S6874 <sup>T</sup>		Monos ( <i>Macaca fascicularis</i> )		Mamíferos sanos, aislado de heces	Harf-Monteil <i>et al.</i> , 2004.
<i>A. sobria</i>	CECT837	+	Peces Agua potable	HG 7		Janda y Abbott, 2010.
<i>A. taiwanensis</i>	A2-50 <sup>T</sup>	+			Infección cutánea y bacteremia	Alperi <i>et al.</i> , 2010a.
<i>A. tecta</i>	F518 <sup>T</sup>	+	Medio ambiente		Diarrea	Demarta <i>et al.</i> , 2008.
<i>A. trota</i>	CECT4255	+		HG 14	<i>A. enteropelogenes</i>	Carnahan <i>et al.</i> , 1991.
<i>A. salmonicida</i> subespecies <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>salmonicida</i></li> <li>• <i>achromogenes</i></li> <li>• <i>mansoucida</i></li> <li>• <i>smitia</i></li> <li>• <i>pectinolytica</i></li> </ul>	CECT894	+	Peces	HG 3		Janda y Abbott, 2010.
<i>A. veronii</i> biotipo <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>sobria</i></li> <li>• <i>veronii</i></li> </ul>	CECT4246 CECT4257	+	Peces	HG 8 HG 10	<i>A. ichthiosmia</i> <i>A. ichthiosmia</i>	Janda y Abbott, 2010.

## DISCUSIÓN GENERAL

La producción de trucha en el estado de México a finales del 2014 generó 28 millones 582, 065.83 pesos (CONAPESCA, 2015). Actualmente el desarrollo de esta actividad se localiza principalmente en los estados de: México, Puebla, Michoacán, Hidalgo, Chihuahua y Veracruz (SAGARPA, 2011). La presencia de enfermedades dentro de las granjas trutícolas en muchos casos es inevitable, debido a diferentes factores como son: manejo de los peces (estrés, hacinamiento, alimentación, medicina preventiva, entre otros), mantenimiento de los estanques (eliminación de la mortalidad, limpieza, eliminación desechos orgánicos, etc.) y calidad del agua (temperatura, oxigenación, sistemas de filtración del agua, etc.) (Pennel y Barton, 1996).

En el presente trabajo de investigación se analizaron las características histológicas de truchas arcoíris infectadas naturalmente con 3 diferentes especies de *Aeromonas* spp. Un aislamiento de *A. veronii* fue obtenido en 2 diferentes truchas. En una trucha se observó la erosión de la dermis y exposición del hueso premaxilar; este tipo de lesión ha sido reportado previamente en carpas que presentaron erosión en la boca y en las que se aislado *A. bestiarum* (Austin y Austin, 2007) - sin embargo no ha sido reportado previamente en la trucha arcoíris; y en otra trucha, se observó la erosión de la aleta dorsal. El aislamiento de *Aeromonas* spp. en aletas lesionadas ha sido previamente reportado por Schneider y colaboradores (1980), quienes sugieren que la participación del género *Flexibacter* y la especie *A. salmonicida* están implicados en el desarrollo de la putrefacción de la aleta en el salmón del Atlántico. Aunque la participación del género *Aeromonas* es menor en comparación con otros patógenos bacterianos como son los géneros *Pseudomonas* y *Vibrio* (Khan *et al.*, 1981), se ha observado que la presencia de *Aeromonas* spp. puede desencadenar la producción de lesiones en aletas (Wahli *et al.*, 2003).

Las lesiones observadas en los hígados de los peces infectados por *A. veronii*, incluyen la presencia de degeneración hepatocelular e infiltración en parénquima en las dos truchas; además de una hemorragia severa y la infiltración intersticial de centros melanomacrófagos en riñón en la trucha que presentó erosión en el premaxilar, lesiones que han sido previamente reportadas (Aydin y Ciltas, 2004). Asimismo, en un estudio realizado en China por Li y Cai (2011) en el cual se obtuvo el aislamiento de *A. sobria* en un brote de putrefacción de aletas, se reveló a la necropsia que los animales infectados experimentalmente presentaban hemorragias irregulares en hígado.

En el presente trabajo se identificó un aislamiento *A. salmonicida* biotipo móvil obtenido de una úlcera localizada en la base de la aleta pélvica derecha de una trucha, la cual presentó un diámetro de 13 milímetros. La identificación de *A. salmonicida* móvil coincide con los aislamientos de Kozińska (2007) quien reportó por primera vez el aislamiento de *Aeromonas salmonicida* biotipo móvil aislado de una trucha arcoíris. Cabe destacar que esta especie ha sido previamente reportada como un microorganismo no móvil (Austin y Austin, 2007), además de ser conocido por producir una infección sistémica, desarrollar úlceras en la piel y causar el cuadro clínico conocido como furunculosis (Goldschmidt-Clermont *et al.*, 2009), asimismo se ha reportado que úlceras ocasionadas por *A. salmonicida* no móvil en salmónidos pueden tener una extensión de 10 mm de diámetro (Brocklebank, 1998) similar a lo observado en el presente trabajo. La presencia de congestión vascular, vacuolización citoplasmática en los hepatocitos y la infiltración periportal de linfocitos, observada a la histopatología, concuerdan con lo observado en truchas arcoíris infectadas experimentalmente con *A. salmonicida* biotipo móvil (Kozińska, 2007).

El aislamiento de *A. hydrophila* en una trucha arcoíris en la cual se identificó macroscópicamente una úlcera en la base de la aleta ventral izquierda con presencia de edema

fueron consistentes con los resultados de Harikrishnan y colaboradores (2010), quienes observaron que al inocular intramuscularmente un aislamiento de *A. hydrophila* en peces dorados, se provocó el desarrollo de protuberancias hemorrágicas en dermis-músculo, lo que derivó a una extensa dermatitis ulcerativa con presencia de edema en la zona infectada.

Los hallazgos histopatológicos observados en branquias de todos los peces estudiados, incluyeron cambios en laminillas secundarias, con hiperplasia de las células epiteliales localizadas en la región basal y apical; pérdida de la arquitectura normal, con diferentes grados de severidad de distribución multifocal; así como telangiectasia y edema. Estas lesiones identificadas no están asociadas en su totalidad al género *Aeromonas*, ya que se ha reportado que factores ambientales como otros agentes en el medio acuático (tóxicos y otros patógenos) pueden ocasionar lesiones similares (Dymowska *et al.*, 2012) y respuestas inespecíficas en laminillas secundarias (Harper & Wolf 2009).

De manera similar, las especies *A. salmonicida*, *A. veronii* y *A. hydrophila*, identificadas genéticamente (Vega-Sánchez *et al.*, 2014a), se han asociado con brotes importantes de enfermedad en peces de ornato y de cultivo con pérdidas económicas significativas en la acuicultura (Pridgeon *et al.*, 2001; Sreedharan *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos del análisis histopatológico confirman que diversas especies de *Aeromonas* tienen un potencial patogénico para la trucha arcoíris, asimismo los hallazgos patológicos descritos en el presente trabajo, fueron la base para estudios de virulencia de estas especies.

El empleo de la trucha arcoíris como modelo de infección ha servido para diferentes patógenos, así como las diferentes vías de infección han sido empleadas para estudiar la patogénesis de *Aeromonas* spp. Los métodos empleados con mayor frecuencia para infectar experimentalmente



a los peces son la vía subcutánea (Carraschi *et al.*, 2012), vía intramuscular (Han *et al.*, 2011) y la vía intraperitoneal (Lago *et al.*, 2012). Sin embargo, éstos no son la vía natural de entrada de *Aeromonas*, como lo son la cohabitación y el baño de inmersión (Pridgeon y Klesius, 2011). Investigaciones previas han empleado el baño de inmersión para la determinar la virulencia de aislamientos obtenidos de brotes (Pridgeon *et al.*, 2011) así como la elaboración de vacunas (Villumsen y Raida, 2013).

En el presente trabajo, la infección experimental con *A. salmonicida* biotipo móvil en una cría de trucha arcoíris ocasionó la presencia de hemorragias petequiales en la zona ventral y en la zona caudal del opérculo, las lesiones microscópicas incluyeron la presencia de formas cocobacilares que atraviesan la pared intestinal en el mismo pez. Esto concuerda con lo reportado en brotes y en infecciones experimentales (Austin y Austin, 2007); estudios previos han demostrado que *A. salmonicida* puede traslocarse desde el lumen intestinal hasta el sistema circulatorio empleándolo como vía de entrada (Jutfelt *et al.*, 2006) y diseminarse en el hospedero (Coscelli *et al.*, 2014). Entre los principales factores que permiten la traslocación bacteriana se encuentran la alteración de la microflora, la reducción del aporte sanguíneo en el tejido y la interrupción de la barrera intestinal mucosa, ocasionada en este caso por la producción de toxinas bacterianas (García de Lorenzo *et al.*, 2007).

Se observaron exoftalmia unilateral y hemorragias leves en el mismo ojo en un pez infectado con *A. Hydrophila*. Las lesiones oculares causadas por la infección de *Aeromonas* han sido previamente reportadas en la trucha arcoíris (Fuentes y Pérez, 1998) y en carpa (*Cyprinus carpio*) (Ha *et al.*, 2010). Estas lesiones oculares están asociadas con la entrada de agentes patógenos que emplean la ruta periorbital para infectar y diseminarse en el sistema circulatorio,

como se ha reportado en un brote de *A. hydrophila* en un ayu (*Plecoglossus altivelis*) (Miyazaki y Jo, 1985).

Las lesiones histológicas observadas en las branquias de todos los peces infectados experimentalmente con las especies *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *A. bestiarum* y *A. veronii*; fueron identificadas. Se observó congestión de laminillas secundarias, hiperplasia de las células epiteliales y levantamiento del epitelio branquial, en diferentes grados de severidad. Estas lesiones microscópicas ocasionaron un incremento en la distancia entre el agua y la sangre que circula por los capilares de las laminillas, ocasionando bajos niveles de oxígeno y en consecuencia la muerte de los individuos por asfixia (Speare *et al.*, 1989). Asimismo el aislamiento bacteriano de los peces infectados por inmersión en branquias, sugieren que estas especies en particular poseen la capacidad de adherirse, colonizar y diseminarse por medio de los capilares a los órganos internos del hospedero, como ocurre en el caso de *Yersinia ruckeri* (Tobback *et al.*, 2009); y evitar los mecanismos de inmunidad no específica como el sistema del complemento y la producción de lisozimas en moco de branquias y piel (Rubio-Godoy *et al.*, 2010).

A la necropsia, los peces que presentaron mortalidad mostraron una congestión generalizada en hígado, con diferentes niveles de severidad, principalmente en los peces infectados con las especies *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *A. veronii*, *A. bestiarum*, *A. sobria* y *A. caviae*. Este signo interno ha sido observado en brotes ocasionados por *A. hydrophila* (Austin y Austin, 2007). De manera similar, se ha observado en infecciones experimentales; por ejemplo, en un estudio realizado por Kozińska (2007), en el que se obtuvo el aislamiento de *A. bestiarum* y *A. veronii* biovariedad *sobria* obtenidas de truchas arcoíris clínicamente sanas y que fueron utilizadas para

realizar una infección experimental; demostró que estas especies son capaces de ocasionar congestión hepática y mortalidad en truchas arcoíris sanas.

En el presente estudio no se observaron en la histopatología formas cocobacillares en los tejidos hepáticos de los cuales se obtuvo aislamiento bacteriológico; esto sugiere que la replicación bacteriana en conjunto con la producción de productos extracelulares puede inducir cambios hemodinámicos, similares a los que se observan en el desarrollo de una septicemia (Rey *et al.*, 2009). La ausencia de bacterias en tejido hepático concuerda con lo reportado por Farto y colaboradores (2011), quienes infectaron experimentalmente róbalo (*Scophthalmus maximus*) con *A. salmonicida* subespecie *salmonicida*, y reportaron que el hígado y el riñón eran raramente colonizados por especies no virulentas, mientras que los aislamientos virulentos fueron capaces de evadir la respuesta inmune a través de diferentes mecanismos.

En el presente trabajo de investigación se procuró en todo momento mantener las condiciones óptimas para todos los grupos de trabajo con el fin de minimizar el estrés. Los aislamientos obtenidos de hígado de los peces infectados con *A. allosaccharophila*, *A. lusitana*, *A. popoffii* y *A. media*, en los que no se presentó signología clínica indican una infección asintomática, como ha sido reportado por Hiney y colaboradores (1994) que realizaron estudios en salmón del atlántico y en trucha café (*Salmo trutta*), para detectar *A. salmonicida* en riñón de peces sanos mediante la aplicación de estrés, sus resultados demostraron el estrés hace más susceptible a los peces a desarrollar un cuadro clínico.

En el presente trabajo se obtuvieron aislamientos de las 10 diferentes especies de *Aeromonas* en tejido hepático, lo que sugiere una preferencia de la bacteria por dicho tejido. Investigaciones realizadas en humanos han demostrado que los pacientes que presenta problemas hepáticos son

susceptibles a la infección del género *Aeromonas* (Clark y Chenoweth, 2003). La infección de *Aeromonas* es adquirida a través del contacto de una herida con suelo contaminado o por consumo de agua contaminada, y se ha sugerido que la bacteria utiliza el tracto gastrointestinal para acceder al tracto biliar y diseminarse por la vía portal hepática (Ko y Chuang, 1995). En el presente trabajo, la exposición de los peces con las diferentes especies de *Aeromonas* por inmersión expuso directamente el tracto gastrointestinal y las branquias, lo que sugiere que la bacterias utilizaron ambas vía para diseminarse en el hospedero. Asimismo, un estudio realizado por Garduño y colaboradores (2000) demostró que *A. salmonicida* emplea la capa S (S-layer) para mediar la adherencia a células no fagocíticas; sin embargo, sugirió que es necesaria la interacción de receptores de superficie celular, lipopolisacáridos (LPS) y otros factores de invasión que no han sido descubiertos.

El utilización de diferentes factores de virulencia en diferentes especies de *Aeromonas* presentan una gran diversidad, algunos factores disponibles para infectar al hospedero pueden estar presentes en algunos aislamientos, mientras que en otros no lo están (Tomás, 2012), asimismo la participación productos extracelulares, proteasas y lipasas son importantes para la virulencia de este género bacteriano (Janda y Abbott, 2010). Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación sugieren que los factores de virulencia están involucrados en el desarrollo del cuadro patológico observado en los animales infectados experimentalmente. Por lo que, el análisis de los aislamientos mediante pruebas moleculares es necesario para esclarecer que factores de virulencia o mecanismos de patogenicidad están presentes.

## CONCLUSIÓN GENERAL

El propósito del presente trabajo de investigación fue determinar la patogenicidad y virulencia de diferentes especies de *Aeromonas*, previamente identificadas que infectan a la trucha arcoíris, por medio de baño de inmersión el cual asemeja las condiciones naturales en las que puede infectarse un pez. Con los resultados obtenidos, se concluye que las especies de *Aeromonas* aisladas de procesos patológicos son más patogénicas y virulentas que las especies aisladas de peces sanos.

Las especies *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *A. veronii* y *A. bestiarum* son las más virulentas para las crías de truchas de arcoíris infectadas por baño de inmersión, ya que ocasionaron la presencia de signología clínica externa e indujeron los porcentajes de mortalidad más elevados, en contraste con las especies *A. caviae* y *A. sobria*, que poseen baja virulencia. Las especies *A. lusitana*, *A. allosaccharophila*, *A. popoffii* y *A. media* son avirulentas en comparación con las especies antes mencionadas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilera-Arreola MG, Hernández-Rodríguez CH, Castro- Escarpulli G. Molecular and phenotypic characterization of *A. hydrophila*-like HG3 strain isolated of an infant with diarrhea in Mexico. *Bioquimia*. 2009; 34: 183-189.
- Austin B y Austin DA. *Bacterial fish pathogens, diseases of farmed and wild fish*. 4ta. Chichester, UK: Praxis Publishing Ltd, 2007: 81-99.
- Aydin S, Ciltas A. Systemic Infections of *Aeromonas hydrophila* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum): gross pathology, bacteriology, clinical pathology, histopathology and chemotherapy. *Int J Anim Vet Adv*. 2004; 12: 810-819.
- Beaz-Hidalgo R, Latif-Eugenín F, Hossain MJ, Berg K, Niemi RM, Rapala J, Lyra C, Liles MR, Figueras MJ. *Aeromonas aquatica* sp. nov., *Aeromonas finlandiensis* sp. nov. and *Aeromonas lacus* sp. nov. isolated from Finnish waters associated with cyanobacterial blooms. *Syst Appl Microbiol*. 2015; 38: 161-168.
- Beaz-Hidalgo R, Martínez-Murcia A, Figueras MJ. Reclassification of *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* Huys et al. 2002 and *Aeromonas aquariorum* Martínez-Murcia et al. 2008 as *Aeromonas dhakensis* sp. nov. comb. nov. and emendation of the species *Aeromonas hydrophila*. *Syst Appl Microbiol*. 2013; 36:171-176.
- Brocklebank JR. Ulcerative dermatitis caused by *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* in farmed Atlantic salmon in British Columbia. *Can Vet J*. 1998; 39: 110.
- Buller NB. *Bacteria from fish and other aquatic animals, a practical identification manual*. USA. CABI publishing, 2004: 75-77.

- Carraschi SP, Da Cruz C, Gonçalves JMN, Ruas de Moraes F, Durival ORJ, Nader AN, Lucas NB. Evaluation of experimental infection with *Aeromonas hydrophila* in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Holmberg, 1887)\*. Int J Fish Aquaculture. 2012; 4: 81-84.
- Castro-Escarpulli G, Aguilera-Arreola MG, Hernández-Rodríguez CH, Arteaga-Caribay NI, Carmona-Martínez AA, Pérez-Valdespino A. La identificación genética de *Aeromonas* una realidad y una necesidad en la microbiología diagnóstica. Bioquímica. 2003a; 28: 11-18.
- Clark NM, Chenoweth CE. *Aeromonas* infection of the hepatobiliary system: report of 15 cases and review of the literature. Clin Infect Dis. 2003; 37: 506- 513.
- CONAPESCA. Registro y estadística pesquera y acuícola. Consulta específica por especie: SAGARPA. Base de datos, 08/10/ 2015 [Citado 08de octubre, 2015]. Disponible en: URL: <http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx>
- Coscelli GA, Bermúdez, Losada AP, Faílde LD, Saltos Y, Quiroga MI. Acute *Aeromonas salmonicida* infection in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) histopathological and immunohistochemical studies. Aquaculture. 2014; 430: 79-85.
- Dror M, Sinyakov MS, Okum E, Dym M, Sredni B, Avtalion RR. Experimental handling stress as infection- facilitating factor for the goldfish ulcerative disease. Vet Immunol Immunopathol. 2006; 109: 279-287.
- García de Lorenzo AM, Acosta JE, Rodríguez JAM. Importancia clínica de la translocación bacteriana. Nutr Hosp. 2007; 22: 50-55.
- Garduño RA, Moore AR, Olivier G, Lizama AL, Garduño E, Kay WW. Host cell invasión and intracelular residence by *Aeromonas salmonicida*: role of the S-layer. Can J Microbiol. 2000; 46: 660-668.

- Goldschmidt-Clermont E, Hochwartner O, Demarta A, Caminada AP, Frey J. Outbreaks of an ulcerative and haemorrhagic disease in arctic char *Salvelinus alpinus* caused by *Aeromonas salmonicida* subsp. *smithia*. Dis Aquat Organ. 2009; 86: 81-86.
- Gordon L, Cloeckert A, Benoît D, Schwarz S, Bouju-Albert A, Jean-Pierre G, Le Bris H, Le Flèche-Matéos A, Giraud E. Complete sequence of the *floR*-carrying multiresistance plasmid pAB5S9 from freshwater *Aeromonas bestiarum*. J Antimicrob Chemother. 2008; 62: 65-71.
- Guevara DJM, Huamaní C, Zerpa R, Valencia E, José MM, Guevara G, Anaya M. *Aeromonas* en la diarrea aguda de niños menores de 5 años. An Fac Med. 2002; 63: 41-45.
- Ha JY, Jo JH, Jun, HK, Gu SK, Woo SP. First report of *Aeromonas veronii* infection in farmed Israeli carp *Cyprinus carpio* in Korea. J Fish Pathol. 2010; 23: 165-176.
- Han H-J, Kim D-Y, Kim W-S, Jung S-J, Oh M-J, Kim D-H (2011) Atypical *Aeromonas salmonicida* infection in the black rockfish, *Sebastes schlegeli* Hilgendorf, in Korea. J Fish Dis. 2011; 34: 47-55.
- Harikrishnan R, Balasundaram C, Moon YG, Kim MC, Kim JS, Dharaneedharan S, Heo MS. Phytotherapy of ulcerative dermatitis induced by *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish (*Carassius auratus*). Acta Vet Hung. 2010; 58: 29-37.
- Harper C, Wolf JC. Morphologic effects of the stress response in fish. Institute for Laboratory Animal Research Journal 50: 387-396. Clin Microbiol Rev 2009; 23: 35-73.
- Hiney MP, Kilmartin JJ, Smith PR. Detection of *Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon with asymptomatic furunculosis infections. Dis Aquat Org. 1994; 19: 161-167.
- Igbinosa IH, Igumbor EU, Aghdasi F, Tom M, Okoh AI. Emerging *Aeromonas* species infections and their significance in public health. ScientificWorldJournal. 2012: 2012; 625023.



- Janda JM y Abbott SL. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection. Clin Microbiol Rev. 2010; 23: 35- 73.
- Janda JM. Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. Clin Microbiol Rev. 1991; 4: 397-410.
- Khan RA, Campbell J, Lear H. Mortality in captive Atlantic cod, *Gadus morhua*, associated with fin rot disease. J Wildl Dis. 1981; 17: 521-527.
- Khan RA, Campbell J, Lear H. Mortality in captive Atlantic cod, *Gadus morhua*, associated with fin rot disease. J Wildl Dis. 1981; 17: 521-527.
- Ko WC, Chuang YC. *Aeromonas* bacteremia: review of 59 episodes. Clin Infect Dis. 1995; 20: 1298-1304.
- Kozińska A, Guz L. The effect of various *Aeromonas bestiarum* vaccines on non-specific immune parameters and protection of carp (*Cyprinus carpio* L.). Fish Shellfish Immunol. 2004; 16: 437-445.
- Kozińska A. Dominant pathogenic species of mesophilic aeromonads isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. J Fish Dis. 2007; 30: 293-301.
- Lago EP, Nieto TP, Farto R. virulence factors of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* strains associated with infections in turbot *Psetta maxima*. Dis Aquat Org. 2012; 99: 145-151.
- Lallier R, Mittal KR, Leblanc D, Lalonde G, Oliver G. Rapid methods for the differentiation of virulent and non-virulent *Aeromonas hydrophila* strains. Develop Biol Stand. 1981; 49: 119-123.
- Li Y, Cai SH. Identification and pathogenicity of *Aeromonas sobria* on tail-rot disease in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus*. Curr Microbiol. 201; 62: 623-627.

- Lund V, Mikkelsen H, Schrøder MB. Atypical furunculosis vaccines for Atlantic cod (*Gadhus morhua*); impact of reattached *Aeromonas salmonicida* A-layer protein on vaccine efficacy. Dis Aquat Organ. 2008; 85: 115- 122.
- Martínez-Murcia A1, Beaz-Hidalgo R, Svec P, Saavedra MJ, Figueras MJ, Sedlacek I. *Aeromonas cavernicola* sp. nov., isolated from fresh water of a brook in a cavern. Curr Microbiol. 2013; 66:197-204.
- Merino S, Rubires X, Knochel, Tomás JM. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. Int J Food Microbiology. 1995: 28; 157-168.
- Murray PR, Jo Baron EP, Faller MA, Tenover FC, Tenover RH. Manual of clinical microbiology. 7ma ed. Washington DC: American Society of Microbiology Press, 2005: 507- 516.
- Nhung PH, Hata HK, Ohkusu M, Noda M, Shah MM, Goto K, Ezaki T. Use of the novel phylogenetic marker *dnaJ* and DNA-DNA hybridization to clarify interrelationships within the genus *Aeromonas*. Int J Syst Evol Microbiol. 2007; 57:1232–1237.
- Nielsen ME, Hoy L, Schmidt AS, Qian D, Shimada T, Shen JY, Larsen JL. Is *Aeromonas hydrophila* the dominant motile *Aeromonas* species that causes disease outbreaks in aquaculture production in the Zhejiang province of China? Dis Aquat Organ. 2001; 46: 23-29.
- Noga EJ. Fish disease, diagnosis and treatment. 2da ed. USA: Wiley- Blackwell, 2010: 185- 190.
- Nordgreen J, Tahamtani FM, Janczak AM, Horsberg TE. Behavioural effects of the commonly used fish anaesthetic tricaine methanesulfonate (MS-222) on zebrafish (*Danio rerio*) and its relevance for the acetic acid pain test. PLoS One. 2014; 9:e92116.

- Palumbo SA, Bencivengo MM, Del Corral F, Williams AC, Buchanan RI. Characterization of the *Aeromonas hydrophila* group isolated from retail foods of animal origin. J Clin Microbiol. 1989; 27: 854-859.
- Paniagua C, Rivero O, Anguita J, Naharro G. Pathogenicity factors and virulence for rainbow trout (*Salmo gairdneri*) of motile *Aeromonas* spp. isolated from a river. J Clin Microbiol. 1990; 28: 350-355.
- Pennel W, Barton BA. Principles of salmonid culture. USA. Elsevier Science, 1996.
- Ping-chung L, Wen-hsiao C, Chih-ching T, Kuo-kau L. Purification of a toxic cysteine protease produced by pathogenic *Aeromonas hydrophila* isolated from rainbow trout. J Basic Microbiol. 2010; 50: 538-547.
- Pridgeon JW, Klesius PH. Virulence of *Aeromonas hydrophila* to channel catfish *Ictalurus punctatus* fingerlings in the presence and absence of bacterial extracellular products. Dis Aquat Org. 2011; 95: 209-215.
- Rey A, Verjan N, Ferguson HW, Iregui C. Pathogenesis of *Aeromonas hydrophila* strain KJ99 infection and its extracellular products in two species of fish. Vet Rec. 2009; 164: 493-499.
- Rubio-Godoy M, Montiel-Leyva A, Martínez-Hernández JA. Comparative susceptibility of two different genetic types of tilapia to *Neobenedenia* sp. (Monogenea). Dis Aquat Organ. 2011; 93: 171-177.
- Rubio-Godoy M. Immunologıa de los peces óseos. Revisión. Rev Mex Cienc Pecu. 2010; 1: 47-57.
- SAGARPA. Aumento de la producción acuícola 32.2 por ciento en 2014: CONAPESCA. Comunicado de prensa NUM.351/15 2015, 2015 [Citado 08de octubre, 2015]. Disponible

en:

URL:

<http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/2015/mayo/Documents/2015B351.PDF>

SAGARPA. Crece producción y consumo de trucha en el país. Comunicado de prensa NUM.378/11, 2011 [Citado 08 octubre, 2015]. Disponible en: URL:

<http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines2/2011/julio/Documents/2011B379.pdf>

Salgado-Miranda C, Palomares E, Jurado M, Marín A, Vega F, Soriano-Vargas E. Isolation and distribution of bacterial flora in farmed rainbow trout from México. *J Aquat Anim Health*. 2010; 22:244-247.

Schneider R, Nicholson BL. Bacteria associated with fin rot disease in hatchery-reared Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can J Fisheries Aquat*. 1980; 37: 1505-1513.

Schneider R, Nicholson BL. Bacteria associated with fin rot disease in hatchery-reared Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can J Fish Aquatic Sci*. 1980; 37: 1505-1513.

Speare DJ, Brackett J, Ferguson HW. Sequential pathology of the gill of Coho salmon with a combined diatom and microsporidian gill infection. *Can Vet J*. 1989; 30; 571-575.

Szczuka E, Kaznowski A. Typing of clinical and environmental *Aeromonas* sp. strains by random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR, and Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence PCR. *J Clin Microbiol*. 2004; 42: 220-228.

Tequianes- Bravo L, Pérez- González DA, González- Malvárez MM, Flores- Pimentel M, Marroquín- Segura R. Aislamiento de *Aeromonas* productoras de aerolisina y enterotoxina, en muestras de agua potable en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y otras dependencias de la Universidad Nacional Autónoma de México. *Bioquímica*. 2005; 30: 23-29.

- Tobback E, Hermans K, Decostere A, Vanden Broeck W, Haesebrouck F, Chiers K. Interactions of virulent and avirulent *Yersinia ruckeri* strains with isolated gill arches and intestinal explants of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis Aquat Org.* 2010; 90: 175-179.
- Villumsen KR, Raida MK. Long-lasting protection induced by bath vaccination against *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in rainbow trout. *Fish & Shellfish Immunology.* 2013; 35: 1649-1653.
- Wahli T, Burr SE, Pugovkin D, Mueller O, Frey J. *Aeromonas sobria*, a causative agent of disease in farmed perch, *Perca fluviatilis* L. *J Fish Dis.* 2003; 28: 141-150.
- Winandy L, Denoël M. Introduced goldfish affect amphibians through inhibition of sexual behavior in risky habitats: an experimental approach. *PLoS One.* 2013; 8: e82736.
- Ya Li, Cai Shuang-Hu. Identification and pathogenicity of *Aeromonas sobria* on tail-rot disease in juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Curr Microbiol.* 2011; 62: 623-627.
- Yang X, Yang QQ, Guo QY, Yi CY, Mao HP, Lin JX, Jiang ZP, Yu XQ. *Aeromonas salmonicida* peritonitis after eating fish in a patient undergoing CAPD. *Perit Dial Int.* 2008; 28: 316-317.
- Yogananth N, Bhakayaraj R, Chanthuru A, Anbalagan T, Nila KM. Detection of Virulence gene in *Aeromonas hydrophila* isolated from fish samples using PCR technique. *Global J Biotech & Biochem.* 2009; 4: 51-53.
- Zepeda VA, Calderón-Apodaca NL, Paasch ML, Martín PG, Paredes DA, Ramírez-Apolinar S, Soriano-Vargas E. Histopathologic findings in chickens experimentally infected with *Gallibacterium anatis* by nasal instillation. *Avian Dis.* 2010; 54: 1306-1309.