Relación entre virulencia y presencia de plásmidos en bacterias *Vibrio fluvialis* y *Vibrio furnissii*, aisladas de pez dorado *(Carassius auratus)*

Relation between virulence and presence of plasmids in bacteria *Vibrio fluvialis* and *Vibrio furnissi* isolated from goldfish *(Carassius auratus)*

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

Abstract

Bacterial strains were isolated from kidneys of ornamental fish of the *Carassius auratus* species. Two bacterial families of ictiopathogenic relevance were presumptively identified: Aeromonadaceae and Vibrionaceae, through the API-20E, API-20NE methods. The identity of these bacteria was confirmed through complementary biochemical tests. The presence of *Aeromonas hydrophila* and two different strains of the genus Vibrio: *Vibrio fluvialis* and *Vibrio furnissii* were also confirmed using the polymerase chain reaction. We confirmed the ability of the *Vibrio* species to induce infection in healthy susceptible fish of the species *Carassius auratus*, according to Koch´s postulates. The strains of both species were cultured in agar- blood plates, observing α-hemolysis in 97% of the grown strains. Alkaline DNA extraction yielded R-plasmids in 87.5 % of the isolated strains with molecular weights from 25 000 bp to 6 000 bp. The relation between the α-hemolytic capacity of the studied strain and the presence of plasmids was confirmed by the lack of hemolysis in agar-blood plates and the inability to produce inhibition halos in the antibiotics test, after curing the plasmids with acridine-orange.

Key words: VIRULENCE, HAEMOLISIS, PLASMID, *VIBRIO FLUVIALIS*, *VIBRIO FURNISSI*, AQUACULTURE.

Resumen

Se aislaron cepas de bacterias del riñón de peces de ornato de la especie *Carassius auratus*, que manifestaron signos y lesiones de infección. Se identificaron especies de dos familias bacterianas de importancia ictiopatogénica: Aeromonadaceae y Vibrionaceae, mediante la técnica API-20E, API-20NE y pruebas bioquímicas complementarias. Se confirmó la identidad de dichas bacterias de acuerdo con la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa y se confirmó presencia de la especie *A. hydrophila* y dos especies diferentes del género *Vibrio*: *Vibrio furnissii* y *Vibrio fluvialis*. Se comprobó la capacidad de provocar infección de las dos especies mencionadas, en peces susceptibles sanos de la especie *Carassius auratus*, según los postulados de Koch. Las dos especies se sembraron en placas de agar sangre, se obtuvo crecimiento con α hemolisis. El 97% del total de las cepas estudiadas mostraron este comportamiento. Se efectuó la extracción alcalina de ADN y se detectaron plásmidos R en 87.5% de las cepas aisladas con pesos moleculares entre 25 000 pb y 6 000 pb. Se comprobó la relación entre la capacidad α-hemolítica de las cepas estudiadas y la presencia de plásmidos al no observar crecimiento con hemolisis en agar sangre ni registrar halos de inhibición en la prueba de antibiosis, después ser curadas las cepas con naranjada de acridina

Palabras clave: VIRULENCIA, HEMOLISIS, PLÁSMIDOS, *VIBRIO FLUVIALIS*, *VIBRIO FURNISSI*, ACUICULTURA.

Recibido el 4 de abril de 2005 y aceptado el 20 de septiembre de 2005.
*Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Departamento El Hombre y su Ambiente, Calz. del Hueso 1 100, Col. Villa Quietud, 04960, México, D. F.
**Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.
***Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Hidrobiología, Av. Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, 09340, México, D. F.

Introduction

With the increase of aquaculture activities, there has been an increment in the importation and exportation of exotic species due to their beauty, which attracts the attention of aquarium owners, as well as public in general. As a consequence, there has also been mobilization of the normal bacterial flora that these individuals have, and as they change environments and come into aquacultural farms with different environmental and sanitary conditions than those in their native environments, their infectious capability could vary and cause serious losses to farms when the strain's virulence is manifested.

In studies by Negrete and Romero[1] performed in farms of the States of Mexico and Morelos, Mexico, bacterial strains such as *Vibrio fluvialis* and *Vibrio furnissii,* were systematically found in samples of kidneys of fish with signs of infection, in water from the production ponds, as well as in balanced and non-conventional feed for fish. These strains were originally reported and isolated by Lee *et al.*,[2] from estuary water samples and feces samples taken from clinical cases. Afterwards, Brenner *et al.*,[3] reported having isolated them from vomit samples of human patients with intestinal infection.

When fish contaminated with virulent bacteria are introduced into production farms and signs of infection appear, the use of antibiotics as prevention and control for the treatment of bacterial infections has caused the selection of bacteria that carry R-plasmids. They are considered to be a potential risk from the public health point of view, since they may be transmitted to bacteria that are also pathogenic for humans.[4]

Even though plasmids do not carry genes that are essential to the host, they may have an important influence in cell phenotype. In some cases, they may codify properties that are fundamental for the bacteria under consideration. The main characteristics that determine pathogenicity or virulence of microorganisms are the capacity to adhere to and colonize specific host sites, as well as the formation of substances such as toxins, enzymes and other molecules that may cause damage to the host.[4] In certain pathogenic bacteria each of the pathogenicity characteristics are coded in plasmids. In *Escherichia coli*, at least two toxins are known to be coded by plasmids: hemolysin, which lyses erythrocytes, and enterotoxin that induces massive water and salt secretion in the intestine.[5]

Hemolysins are extra-cellular proteins that are considered to be virulent factors produced by pathogenic microorganisms that contribute to the

Introducción

Con el incremento de la actividad acuícola y el cultivo de especies exóticas de peces que por su belleza atraen el interés de los acuaristas y del público en general, su importación y exportación aumentó. Como consecuencia de ello, se propició la movilización de la flora bacteriana normal que portan esos individuos, la cual, al cambiar de ambiente e ingresar a granjas acuícolas con condiciones ambientales y sanitarias de producción diferentes a las nativas, puede variar su capacidad infecciosa y provocar importantes pérdidas en los cultivos al manifestarse la virulencia de las cepas.

Negrete y Romero[1] informan que en granjas del Estado de México y de Morelos, México, se aislaron las cepas *Vibrio fluvialis* y *Vibrio furnissii* (inicialmente notificadas y aisladas por Lee *et al.*[2]) de muestras de riñón de peces con signos de infección, así como de agua de estanques de cultivo y de alimento balanceado y no convencional para peces, a partir de muestras de agua de estuarios y de muestras clínicas de heces. Posteriormente, Brenner *et al.*[3] notifican haberlas aislado en muestras de vómito de pacientes humanos con signos de infección intestinal.

Al ingresar peces contaminados con bacterias virulentas y presentarse signos de infección en la producción, el uso de antibióticos como prevención y control en el tratamiento de infecciones provocadas por estas bacterias, ha ocasionado la selección de bacterias portadoras de plásmidos R, que constituyen un peligro potencial desde el punto de vista de salud pública, ya que pueden ser transmitidos al ser humano a través de bacterias que son igualmente patógenas para el humano.[4]

Aunque los plásmidos no llevan genes esenciales para el portador, son de importancia en el fenotipo celular. En algunos casos codifican propiedades esenciales para la bacteria en cuestión. Las principales características que determinan la patogenicidad o virulencias de los microorganismos son su capacidad para fijarse y colonizar lugares específicos del portador, y la formación de sustancias como toxinas, enzimas y otras moléculas que causan daño a éste.[4] En algunas bacterias patógenas cada una de estas características de patogenicidad está codificada en plásmidos. En *Escherichia coli* se conocen al menos dos toxinas que están codificadas en plásmidos: hemolisina, que lisa los glóbulos rojos; y enterotoxina, que induce secreción masiva de agua y sales en el intestino.[5]

Las hemolisinas son proteínas extracelulares, así como factores de virulencia; las producen microorganismos patógenos que contribuyen al establecimiento y mantenimiento de la infección y actúan en la membrana citoplasmática de la

establishment and maintenance of infection and act on the cytoplasmic membrane of the host cell causing their lysis. Virulence of certain pathogenic bacteria in fish has been related to different factors. Toranzo and Barja[6] associated this capacity with different biochemical characteristics in *Vibrio anguillarum,* while Crosa *et al.*,[7, 8] have demonstrated that *V. anguillarum* virulence is related to the presence of plasmids with molecular weight of 47×10^6 bp.

Fish obtained from the studied farms, from which *A. hydrophila*, *V. fluvialis* and *V. furnissii* strains have been systematically isolated, have shown signs and lesions of infection corresponding to the clinical syndrome of ulcerative dermonecrosis and hemorrhagic septicemia,[9] and thus the relationship between the presence of plasmids with virulence of these bacterial species is to be taken into consideration. Therefore, the objective of this study is to establish the relationship between virulence as a factor of pathogenicity with the presence of plasmids in *V. fluvialis* and *V. furnissii*.

Materials and methods

During a retrospective analysis of the sanitary conditions of handling in aquaculture farms in Morelos, Mexico, in the year 2000, sick fish of the *Carassius auratus* species were observed with signs and lesions of infection. These individuals were extracted from the ponds with a spoon net. The fish were placed in a tub with water and were anesthetized with tricaine sulfomethane (0.1 g/L). After euthanasia was carried out, kidney samples were obtained from the fish with a sterile bacteriological loop,[10,11] and spread in tubes with alkaline peptone water (pH9) and incubated at 20 °C for 24 h. Later they were spread into saccharose-bile salts-citrate-thiosulfate agar plates (SBCT) and were incubated at room temperature for another 24 h. The colonies that were obtained were subjected to a purification process by successive spread in agar plates with the same medium. When the homogeneity of the cellular morphology was obtained, gram staining was carried out. Finally, the gram-negative strains were identified through API-20 and API-20NE[12,13] commercial test sets, as well as complementary biochemical tests according to the criteria set out by different researchers.[2,3,14-18] With the identified biochemical profiles a similitude analysis was carried out in order to select the best possible identification. For this, the Jaccard index was applied comparing the biochemical profile obtained for each strain with the theoretical profiles proposed by both API data bases and complementary tests that were carried out.

All identification techniques were also applied to collected strains: *Aeromonas hydrophila* (ATCC 356554),

célula portadora, los eritrocitos, provocando su lisis. La virulencia de algunas bacterias patógenas de peces ha sido relacionada con diferentes factores. Toranzo y Barja[6] asocian esta capacidad con diferentes características bioquímicas en *Vibrio anguillarum*, y Crosa *et al.*[7,8] han demostrado que la virulencia en *V. anguillarum* se relaciona con la presencia de plásmidos con peso molecular de 47×10^6 bp.

Los peces obtenidos de las granjas estudiadas, a partir de los cuales se aislaron las cepas *A. hydrophila*, *V. fluvialis* y *V. furnissii*, mostraron signos y lesiones de infección que indican el síndrome de dermomionecrosis ulcerativa y septicemia hemorrágica,[9] lo cual plantea la relación de los factores de virulencia de dichas especies con presencia de plásmidos. Por tanto, este estudio pretende establecer la relación de la virulencia como factor de patogenicidad con presencia de plásmidos en *V. fluvialis* y *V. furnissii*.

Material y métodos

Durante el análisis retrospectivo de las condiciones sanitarias de manejo de granjas acuícolas de Morelos, México, en 2000, se observaron peces enfermos de la especie *Carassius auaratus*, que manifestaban signos y lesiones de infección. Estos individuos fueron extraídos de los estanques con una red de cuchara. Los peces se colocaron en una tina con agua y fueron anestesiados con sulfometano de tricaína (0.1 g/L). Después de ser practicada la eutanasia, se obtuvieron muestras del riñón de los peces con una asa bacteriológica estéril,[10,11] éstas se sembraron en tubos con agua peptonada alcalina (pH 9) y se incubaron a 20°C durante 24 h. Posteriormente se sembraron en placas de agar de tiosulfato-citrato-sacarosa-sales biliares (TCBS) y se volvieron a incubar a temperatura ambiente durante 24 h. Las colonias obtenidas fueron sometidas a resiembras sucesivas en placas agar del mismo medio de cultivo y una vez obtenida homogeneidad en la morfología celular, se efectuó la tinción de gram. Finalmente las cepas gramnegativas fueron identificadas mediante los estuches comerciales API-20 y API-20NE[12,13] y pruebas bioquímicas complementarias según los criterios de diferentes investigadores.[2,3,14-18] Con los perfiles bioquímicos identificados se efectuó un análisis de similitud, a fin de seleccionar la mejor identificación, y se aplicó el índice de Jaccard, comparando el perfil bioquímico obtenido para cada cepa con los perfiles teóricos de las propuestas por las bases de datos de ambos API y de las pruebas complementarias efectuadas.

Las técnicas de identificación fueron aplicadas a las cepas de colección: *Aeromonas hydrophila* (ATCC 356554), *Aeromonas caviae* (ATCC 15468), *Vibrio*

Aeromonas caviae (ATCC 15468), *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC17802), *Vibrio alginolyticus* (ATCC 17749), *Vibrio fluvialis* (NCTC 11327) and *Vibrio furnissii* (ATCC 35016).

Identification of *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis* and *Vibrio furnissii* strains was confirmed using the polymerase chain reaction. Both the wild strains, as well as the collected ones were spread in Luria-Bertani (LB) agar, and were incubated at 30 ºC for 24 h. The colonies that were obtained were spread in tubes with agar broth of the same media and were incubated in a water bath at 300°C for 24 h with a stirrer set at 4666 g for 30 s. Cell cultures were centrifugalized at 4666 g/s for 10 min and lysed with 5.5% SDS and 0.125 mg/mL of proteinase-K. A 1 mL aliquot was extracted from the culture that was obtained and passed into a 1.2 mL Eppendorff microtube. Plasmid DNA was extracted using a QIAGEN DNA-EASY-KIT system, following the instructions of the manufacturer. The product was kept in Eppendorff microtubes at –20°C. In order to determine the presence of Aeromonas ologonucleotides* Aer8 5'-CTGCTGG CTGTACGTTACTCGCAG.3' and Aer9 5'-TTCGCCAC CGGTATTCCTCCAAGATC-3' proposed by Khan and Cerniglia[19] were used.

Oligonucleotides Vib1 5´-TCACTACCGAGAGGA ACATC-3´' and Vib2 5'- GGTGGAGGTGCCGTGCA-3´ designed by Zanetti *et al.*,[20] were used to amplify *Vibrio*.

The amplification reaction was carried out using a thermocycler** and the PCR reaction kit. ***

The following mix was prepared in flat cap PCR microtubes: 65 µl sterile water free from RNA and DNA, 5 µL buffer [100 mmol-1] tris -HCL(pH 8.3), 10 µL 2mM d-NTP mix, 10 µL oligonucleotide I, 10 µL oligonucleotide II, 6 µL 25mM $MgCl_2$, 10 µL DNA, and 10 µL Taq DNA polymerase. The samples were run with the following amplification program: pre-incubation at 95°C, for 2 min; followed by thirty cycles of, denaturing at 94°C, 1 min; annealing at 68°C, 1 min; extension 72°C, 1 min. After the last cycle, the tubes with the PCR product were incubated for a final extension at 72°C for 3 min.[20]

Later 5 µL of the reaction product were placed in an Eppendorff microtube and 45 µL of SIGMA-CHEMICAL load buffer were added.† These were then run in 1% agar gel electrophoresis. Products were visualized with 30 µL 0.5 mg/mL ethidium bromide stain under ultraviolet light. In the first well of each run a 10 000 bp molecular weight marker was placed. Photographs were taken with a photographic camera.* The procedure was repeated with the oligonucleotides mentioned above and with all the strains previously identified such as *A. hydrophila, V. fluvialis* and *V. furnissii*.

parahaemolyticus (ATCC17802), *Vibrio alginolyticus* (ATCC 17749), *Vibrio fluvialis* (NCTC 11327) y *Vibrio furnissii* (ATCC 35016).

Se identificaron las cepas de Aeromonas hydrophila, *Vibrio fluvialis* y *Vibrio furnissii* con reacción en cadena de la polimerasa, con ese fin se sembraron cepas silvestres y de colección en agar de Luria-Bertani (LB) y se incubaron a 30ºC por 24 h. Las colonias obtenidas se sembraron en tubos con caldo de agar del mismo medio y se incubaron en baño María con agitación de 4 666 g por 30 seg a 30ºC por 24 h. El cultivo de células se cosechó por centrifugación a 4 666 g/seg por 10 min y lisadas a 5.5% de SDS en 0.125 mg/mL de proteinasa K. Con una pipeta se extrajo una alícuota de 1 mL del cultivo y se pasó a un microtubo Eppendorff de 1.2 mL. Se extrajo el ADN plasmídico con el sistema ADN-EASY-KIT de QIAGEN, se siguieron indicaciones del fabricante. El producto se guardó en microtubos Eppendorff a –20°C. Para determinar la presencia de Aeromonas se emplearon los oligonucleótidos* Aer8 5'-CTGCTGGC TGTACGTTACTCGCAG.3' y Aer9 5'-TTCGCCA CCGGTATTCCTCCAAGATC-3' propuestos por Khan y Cerniglia.[19]

Para amplificar *Vibrio* se utilizaron los oligonucleótidos Vib1 5´-TCACTACCGAGAGGAA CATC-3´' y Vib2 5'-GGTGGAGGTGCCGTGCA-3´ diseñados por Zanetti *et al.*[20]

La reacción de amplificación fue llevada a cabo con un termociclador** y el equipo de reacción para CRP.***

En microtubos para PCR planos se conformó la siguiente mezcla: 65 µL de agua estéril libre de ARN y ADN, 5 µL de amortiguador [100 mmol-1] tris -HCL(pH 8.3), 10 µL 2 mM de NTP mix, 10 µL del oligonucleótido I, 10 µL del oligonucleótido II, 6 µL 25 mM $MgCl_2$ sol, 10 µL ADN, 10 µL Taq ADN polimerasa. Las muestras fueron sometidas al siguiente programa de amplificación: preincubación a 95°C, durante 2 min, una vez; treinta ciclos desnaturalización, 94°C, 1 min; 1 alineación 68°C; 1 min; extensión 72ºC, 1 min. Después del último ciclo los tubos con el producto de PCR fueron incubados a 72ºC por 3 min.[20]

Posteriormente se depositaron 5 µL de la mezcla de la reacción en un microtubo Eppendorff y se añadieron 45 µL del amortiguador de carga,† después se corrió en electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los productos fueron visualizados por tinción con 30 µL de bromuro de etidio (0.5 mg/mL) bajo luz ultravioleta. En los primeros pozos de cada corrida se colocó el marcador de peso molecular de

*BQ Providers.
**Techgen.
***Fermentas.
†Sigma-Chemical.

Virulence of the isolated wild strains was evaluated experimentally in the following manner.

Thirty clinically healthy fishes of the *Carassius auratus* species were selected and observed for eight days before inoculation; the individuals that showed any infection sign or lesion were substituted by another healthy one of the same species. This was done so that only healthy individuals would be used. Immunoglobulins were tittered in order to know if these fish had any prior contact with the pathogen species under study. Two mL of blood were extracted from the fish under observation, the sample was centrifuged and the serum used for an agglutination reaction test using the parallel dilution technique.[21]

With a calibrated bacteriological loop, three loopfuls of each strain were inoculated in 50 mL Brain-heart-infusion broth (BHI). The mixes were incubated in a water bath with stirring at room temperature for 24 h. Dilutions were prepared from 10^7 to 10^3 to be able to identify the colony forming units per inoculum milliliter (cfu/ml).[22] The inoculum concentration that defined LD_{50} for each strain was established according to criteria determined experimentally for *V. fluvialis* and *V. furnissii*, by Negrete and Romero.[23] Simultaneously, three aquariums were installed with ten fish within each one. The first lot of fish was inoculated with 1 mL of sterile saline solution per 100 g fish weight[24] in order to detect the impact of the experiment on the fish. The other fish were inoculated with the same dose at 10^5 cfu/mL inoculum concentration of *V. fluvialis* and *V. furnissii*.

The growth inhibition method was used to detect susceptibility of the identified strains to the different antibiotics.[25] Luria-Bertani (LB) agar plates were spread and incubated at 30ºC, for 24 h. Once the colonies grew, they were transferred to a tube with 5 mL LB broth, until 0.5 Mc Farland turbidity was reached.[26] Following that, Móeller-Hinton agar plates were spread with a sterile swab; after 15 min, multidiscs for gram-negative bacteria were placed on the plates.** The following antibiotics at the concentrations indicated were included: cephalothin (CF),30 µg; chloramphenicol (CL), 30 µg; ceftriaxone (CRO), 30 µg; ampicillin (AM), 10 µg; amikacin (AK), 30 µg; trimethoprim (SXT), 30 µg; cefotaxime (CTX), 30 µg; netilmicine (NET), 30 µg; pefloxacin (PEF), 5 µg; carbenicillin (CB), 100 µg; nitrofurantoin (NF), 300 µg Additionally filter paper disks were placed, which had the same characteristics and were impregnated with the following antibiotics: kanamycin (K), 30 µg; and tetracycline (T), 30 µg.* They were incubated at 30ºC for 24 h, and then the inhibition halos were measured with a Vernier caliper. Strains were classified as resistant (R), intermediate (I) or susceptible (S), depending on the diameter of the

10 000 pb. Para las fotografías se utilizó una cámara fotográfica.* El procedimiento se repitió con dichos oligonucleótidos y con todas las cepas identificadas previamente como *A. hydrophila*, *V. fluvialis* y *V. furnissii*.

Se evaluó experimentalmente la virulencia de las cepas silvestres aisladas, con ese propósito se procedió como se describe en seguida.

Previamente se seleccionaron 30 peces sanos de la especie *Carassius auratus*, que fueron observados durante ocho días, antes de ser inoculados; los peces que manifestaron algún signo o lesión de infección fueron sustituidos por otro de la misma especie, pero sano. Lo anterior con la finalidad de que se dispusiera sólo de ejemplares sanos. Para saber si estos peces habían tenido contacto previo con alguno de los patógenos de las especies problema, se titularon inmunoglobulinas, extrayendo 2 mL de sangre a los peces en observación. La muestra de sangre fue centrifugada y con el suero sanguíneo se efectuó la reacción de aglutinación usando la técnica de dilución paralela.[21]

Los diferentes inóculos fueron preparados sembrando tres asadas de las cepas en 50 mL de caldo de infusión cerebro-corazón (IBH), con una asa bacteriológica calibrada. Las mezclas fueron incubadas en baño María con agitación a temperatura ambiente durante 24 h. Los inóculos se diluyeron desde 10^7 hasta 10^3 para conocer las unidades formadoras de colonias por mililitro de inóculo (cuf/mL).[22] la concentración de los inóculos que definió la $D_{50}L$ para cada cepa se estableció sobre la base de los criterios establecidos experimentalmente para *V. fluvialis* y *V. furnissii*, por Negrete y Romero.[23] Simultáneamente se instrumentaron tres acuarios con diez peces cada uno. En un primer lote los peces fueron inoculados con 1 mL de solución salina estéril por cada 100 g de peso de pez[24] con el propósito de reproducir el impacto experimental sobre los peces. Los peces de los restantes acuarios fueron inoculados con la misma dosis a la concentración del inóculo de 10^5 ufc/mL de las cepas de *Vibrio fluvialis* y *Vibrio furnissii*.

La susceptibilidad de las cepas identificadas a diferentes antibióticos se determinó con el método de difusión en placa.[25] Para ello se sembraron en placas de agar de Luria-Bertani (LB) y se incubaron a 30ºC, por 24 h. Luego las colonias crecidas se trasladaron a un tubo con 5 mL de caldo de LB, hasta obtener turbidez de 0.5 de McFarland.[26] Con un hisopo estéril se sembraron los cultivos en placas de agar de Móeller-Hinton, después de 15 min se colocaron multidiscos para gramnegativas,** que incluyen antibióticos en las concentraciones indicadas:

*Polaroid.
** Sanofi, México.

halos, which included the diameter of the discs. (6 mm).[27-29]

Plasmid extraction was carried out using the alkaline lyses technique.[30] Once more the strains were spread in Luria-Bertani (LB) agar plates, incubated at 30ºC for 24 h; and then the colonies were placed in tubes with 5 mL LB broth and incubated in a water bath at 30ºC for 24 h with stirrer. Two mL of the culture were transferred into another Eppendorff sterile microtube and centrifuged at 4666 g for 30 s, and the resulting supernatant was discarded.

The pellet at the bottom of the Eppendorff tube was re-suspended in 100 µL of lysozyme solution by a 1 min vortex. After that it was incubated on ice for 30 min, then 200 µL of duodecil sodium sulfate were added, mixed softly by inversion and incubated for 5 min on ice. Later 150 µL of 3M sodium acetate were added, softly mixed by inverting the tube and incubated for another 60 min. The tubes were then centrifuged for 5 min at 4666 g/s, the supernatant was transferred to another sterile Eppendorff microtube, 1000 µL of ice-cold ethanol were added, incubated for 30 min and then centrifuged once more for 30 min at 4666 g/s. The supernatant was removed, and the remaining pellet was dissolved in 100 µL of 0.1M sodium acetate and 0.05M pH 8 tris. This product was precipitated again with 300 µL of ice-cold ethanol.

The supernatant was discarded and 10 µL of a 5X sample buffering solution were added (25% saccharose, 5 mM sodium acetate, 0.05% bromophenol blue and 0.1% SDS)

The extractions were treated with I-AS type bovine pancreatic RNAse at a concentration of 0.01 µg/mL and incubated in a water bath at 60 ºC for 10 min.

A total of 10 µL of these samples were placed in the wells of 0.6% agar gels for electrophoresis together with a known molecular weight marker: Gener Ruler TM 1 Kb DNA Ladder.[31] The gels were prepared with 0.5X TB borate running buffer and 0.6X agarose. The gels were run at 70 V, 250 W for 45 minutes and stained with a 0.5 µg/mL ethidium bromide solution in distilled water. Once the gels were stained they were washed with water for 30 s to remove the excess of ethidium bromide and then placed in a short wave UV ray transilluminator. The gels were photographed with an instant Polaroid camera* with 667 film cartridges, fitted to the transilluminator.**

Relative motility of the plasmids and the reference marker were measured. Then by applying an inverse rule of three the number of base pairs was obtained, as a function of the number of base pairs known in the marker (10 000 bp).

The strains that had plasmids were spread onto blood agar to which 5% defibrinated blood from sheep was added and were incubated at room temperature

cefalotina (CF), 30 µg; cloranfenicol (CL), 30 µg; ceftriaxona (CRO), 30 µg; ampicilina (AM), 10 µg; amikacina (AK), 30 µg; trimetoprim (SXT), 30 µg; cefotaxima (CTX), 30 µg; netilmecina (NET), 30 µg; pefloxacina (PEF), 5 µg; carbeniclina (CB), 100 µg; nitrofurantoína (NF), 300 µg. Además se colocaron discos de papel filtro con las mismas características, impregnados con kanamicina (K), 30 µg; y tetraciclina (T), 30 µg.* Se incubaron a 30ºC por 24 h, después se midieron los halos de inhibición con un Vernier. Las cepas se clasificaron en resistente (R), intermedio (I) o susceptible (S), según el diámetro de los halos, incluyendo el diámetro de los discos (6 mm).[27-29]

La extracción de plásmidos se hizo con la técnica de lisis alcalina.[30] De nuevo las cepas se sembraron en placas de agar de Luria-Bertani (LB), y se incubaron a 30ºC durante 24 h; luego las colonias crecidas en tubos con 5 ml de caldo de LB se incubaron en baño María con agitación a 30ºC por 24 h, 2 mL del cultivo se transfirieron a otro microtubo estéril Eppendorff y se centrifugó a 4 666 *g* por 30 seg, el sobrenadante se removió.

La pastilla que permaneció en el fondo del tubo Eppendorff se resuspendió con 100 µL de solución de lisosima y se resuspendió agitándose con un vórtex durante 1 min. Después se incubó en hielo durante 30 min, se agregaron 200 µL de duodecil sulfato de sodio; se mezcló suavemente por inversión y se incubó durante 5 min en hielo, después se añadieron 150 µL de acetato de sodio 3 M, otra vez se mezcló de manera suave por inversión del tubo y se incubó por 60 min, nuevamente se centrifugó durante 5 min a 4 666 *g*/seg, el sobrenadante se transfirió a otro microtubo Eppendorff estéril, añadiendo 1 000 µL de etanol frío, se incubó 30 min y se centrifugó 30 min a 4 666 *g*/seg, el sobrenadante se removió, la pastilla se disolvió con 100 µL de acetato de sodio 0.1M y tris 0.05M pH 8, reprecipitando en 300 µL de etanol frío.

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

Las muestras se trataron con RNAsa pancreática de bovino tipo I-AS, a concentración de 0.01 µg/mL, se incubaron en baño María a 60ºC durante 10 min.

Se aplicaron 10 µL de las muestras obtenidas en los pozos de los geles de agarosa al 0.6% para el análisis por electroforesis. Los geles se prepararon con amortiguador borato TB de corrida al 0.5X y 0.6X de agarosa. La electroforesis se llevó a cabo a 70 V de voltaje, 250 W de poder. Los geles fueron teñidos durante 45 min y revelados con una solución de bromuro de etidio disuelto en agua destilada a concentración de 0.5 µg/mL. Una vez teñidos los

*Sigma Chemical.

during 24 h. After this, plasmid curing was carried out.

Plasmid carrying strains were spread onto LB agar and incubated at room temperature during 24 h. Next day, samples were taken with a sterile swab from the colonies that grew and were inoculated into 5 mL tubes with LB broth and incubated at room temperature during 24 h. After that, 2 mL of this culture with the grown strains were transferred into 2 mL tubes with LB broth with added acridine-orange at a concentration of 0.9 µg/mL during 9 days and then incubated at room temperature during 24 h.

After that time, each strain was spread onto the following medium: *a)* blood agar with 5% defibrinated blood from sheep; *b)* in LB agar plates; and *c)* in Möller and Hinton agar plates to carry out another antibiosis test, following the plate diffusion technique (Difco), all plates were incubated at room temperature for 24 h.

Alkaline extraction of plasmids was carried out on the strains that grew in LB, and electrophoresis was performed in agar gel following the steps previously described.

All of the above procedures were mirrored with the collected strains: *Aeromonas hydrophila* (ATCC356), *Aeromonas caviae* (ATCC154), *Vibrio alginolyticus* (ATCC177), *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC178), *Vibrio fluvialis* (NCTCC35654) and *Vibrio furnissii* (ATCC 35016).

Results

Several bacteria species were isolated from 30 *C. auratus* fish, belonging to the following families: Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae, Aeromona daceae and Vibrionaceae.

As a result of the complementary tests that were carried with the strains of the last two families, which are of interest for this study, the presence of strains of the *A. hydrophila* species, *V. furnissii* species as well as of *V. fluvialis* species was confirmed (Table 1).

From the comparison of the biochemical profiles of the strains mentioned with those of *V. fluvialis*, we showed that the latter was similar to nine species of the *Aeromonas* genus: *A. sobria*, 0.95; *A. eucrophilia*, 0.95; *A. shubertii*, 0.90; *A. media*, 0.85; and *A. sal. salmonicida*, 0.85. When similitude analysis was applied to API-20E and API-20NE complementary biochemical tests and Bergeys´ Manual to differentiate *A. hydrophila* from *V. fluvialis*, the Jaccard index was 0.95, with a greater similitude between *A. hydrophila* with *V. furnissii* (0.99).

Applying oligonucleotides Aer8 and Aer9, as well as Vib1 and Vib2 in a polymerase chain reaction, we achieved amplification of bacterial DNA from those

geles, se lavaron con agua durante 30 seg con el fin de eliminar excesos de bromuro de etidio, fueron colocados en un transiluminador de rayos UV de longitud de onda corta. Las fotografías de los geles fueron tomadas con transiluminador con cámara fotográfica* instantánea con cartuchos de película.**

Las extracciones de ADN plasmídico procedentes de las cepas aisladas se corrieron en gel con el marcador de peso molecular Gene Ruler TM Ikb DNA Ladder;[31] finalmente se midió la movilidad relativa de los plásmidos y del marcador de referencia, con una regla de tres inversa para obtener los pesos moleculares en número de bases de pares, en función del número de pares de bases conocido del marcador (10 000 pb).

Las cepas que presentaron plásmidos se sembraron en agar sangre al que se le añadió 5% de sangre de borrego desfibrinada, y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 24 h. Posteriormente se llevó a cabo la curación de plásmidos.

Las cepas portadoras de plásmido sembraron en agar de LB y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 24 h. Al otro día, con un hisopo estéril se tomó una muestra de las colonias crecidas y se sembraron en tubos 5 mL de caldo de LB, se incubó a temperatura ambiente 24 h. Luego 2 mL de este cultivo conteniendo las cepas se transfirieron a tubos con 2 mL de caldo de LB con naranja de acridina a concentración de 0.9 µg/mL durante nueve días, y se incubaron a temperatura ambiente durante 24 h.

Después de ese tiempo cada cepa se sembró: *a)* en cajas con agar sangre con 5% de sangre de borrego desfribinada; *b)* en cajas con agar LB; y *c)* se dejaron crecer en placas con agar de Möller y Hinton y de nuevo efectuar antibiograma, siguiendo la técnica de difusión de placa (Difco), todas las cajas se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 24 h.

Con las cepas que crecieron en LB se efectuó de nuevo la extracción alcalina de plásmidos y se corrieron en gel de agarosa siguiendo los mismos pasos que se describieron anteriormente.

Todo el procedimiento se replicó con cepas de colección: *Aeromonas hydrophila* (ATCC356), *Aeromonas caviae* (ATCC154), *Vibrio alginolyticus* (ATCC177) y *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC178), *Vibrio fluvialis* (NCTCC35654) y *Vibrio furnissii* (ATCC 35016).

Resultados

Se aislaron diferentes especies de bacterias de las familias Seudomonadaceae, Enterobacteriaceae, Aeromona-daceae y Vibrionaceae a partir de 30 peces *C. auratus*.

* Polaroid.
** Polaroid 667.

in this study allowing differentiation at the genus level, thus establishing a difference between strains that belonged to the *Aeromonas* and *Vibrio* genera. This technique was applied to 60 strains that had been previously identified with API 20-E and API 20NE as well as with complementary biochemical tests as *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis* or *Vibrio furnissii*. The results coincided in genus identification in 59 of the cases. Only strain 131 previously identified as *A. hydrophila* did not coincide.

The PCR technique was performed using the collection of strains (mentioned above) and both the biochemical and the PCR technique also gave correct identification (Figures 1 and 2).

Ninety-seven percent of the strains of *A. hydrophila, V. fluvialis* as well as *V. furnissi,* grew in blood agar, forming a brownish-green zone surrounding the colony (Figure 3).

We experimentally replicated the clinical signs of infection that were present in fish of the farms where the strains were isolated from. Clinical

Como resultado de las pruebas complementarias efectuadas a las cepas de las dos últimas familias, de interés para el presente estudio, se confirmó presencia importante de cepas de la especie *A. hydrophila*, cepas de la especie *V. furnissii* y cepas de la especie *V. fluvialis* (Cuadro 1).

De la comparación de los perfiles bioquímicos de las cepas con los perfiles para *V. fluvialis*, se obtuvo que esta última presentó similitud con nueve especies del género de *Aeromonas*: *A. sobria*, 0.95; *A. eucrophilia*, 0.95; *A. shubertii*, 0.90; *A. media*, 0.85; *A. sal. salmonicida*, 0.85. Al aplicar el análisis de similitud de las pruebas bioquímicas complementarias API-20E y API-20NE y del Manual de Bergeys para diferenciar a *A. hydrophila* de *V. fluvialis* el índice de Jaccard fue de 0.95, siendo mayor la similitud (0.99) entre *A. hydrophila* con *V. furnissii*.

Con la aplicación de los oligonucleótidos Aer 8 y Aer9, así como Vib1 y Vib2 durante la reacción en cadena de la polimerasa, se logró la ampliación de ADN de las bacterias estudiadas, pero a nivel de género, con lo que se logró establecer la diferencia entre las

Cuadro 1

CARACTERES BIOQUÍMICOS ESPECÍFICOS PARA DIFERENCIAR *V. furnissii* (ATCC 35016), *V. fluvialis* (NCTC 11327), *A. hydrophila* (ATCC 35649) Y CEPAS SILVESTRES

SPECIFIC BIOCHEMICAL CHARACTERS TO DIFFERENTIATE *V. furnissii* (ATCC 35016), *V. fluvialis* (NCTC 11327), *A. hydrophila* (ATCC 35649) AND WILD STRAINS

			V.		*A.*	
Test	*V furnissii*	*Wild strains*	*fluvialis*	*Wild strains*	*hydrophila*	*Wild strain.*
Glucose gas	(+) 100	(+) 33	(–) 0	(–) 43	(+) 100	(+) 24
Cellobiose	(–) 14	(–) 61	(+) 30	(+) 38	(–) 11	(–) 38
Growth in NaCl%						
0%	(–) 0	(+)	(–) 0	(+)	(+) 100	(+)
1%	(+) 99	(+)	(+) 99	(+)	(+) 100	(+)
3%	(+) 99	(+) 80	(+) 99	(+) 80	(+) 7	(–) 20
7%	(+) 78	(+) 80	(–) 71	(+) 80	(–) 0	(–) 10
Putrecin	(+) 100	(+) 93	(+) 31	(–) 7	(–) 0	(–) 7
Citrulin	(–) 0	(-) 10	(–) 31	(+) 90	(–) 0	(–) 10
Propionate	(+) 0	(+)	(–) 27	(–)	(–) 0	(–)
TCBS	(+) Yellow	(+) Yellow	Yellow	Yellow	Blue-green	Blue-green
Sensitivity to vibriostatics o/129, 10 µg	(–) 0	(–) 0	(–) 31%	(–)	(+)	(+)

(+) 90-100% positive reaction

(–) 0-10% negative reaction

* Reaction in collection strains

Complementary biochemical tests according to: Colwell, 1984; Cown, 1974; Furniss *et al*., 1977; Lee *et al*., 1981; Brenner *et al*., 1983; Altewegg *et al*., 1990; Daslgaard *et al*., 1998; Bergey Manual, 1999.

signs caused by *V. fluvialis* were characterized by nervousness in most of the inoculated individuals, hemorrhagic and folded fins, gasping at the surface of the water, protruding abdomen, and excessive mucous on the surface of the body. At the necropsy of dead individuals, generalized hemorrhages were observed in all internal organs.

Clinical signs of individuals inoculated with *V. furnissii* showed, in general, the same semeiology than the previous pathogen, with the difference that in this case ocular hemorrhages were also observed in the inoculated individuals.

Inhibition halos were present for the following antibiotics: cephalothin, tetracycline, netilmicine, ampicillin, carbenicillin, kanamycin, cefotaxime, nitrofurantoin, and ceftriaxone (Figure 4).

Strains of the *A. hydrophila* species showed resistance to the following antibiotics: CF, T, NF, AMP, CB, and K, and contained R-plasmids between 25.7 and 6.6 kbp; *V. fluvialis* strains showed resistance to CF, AMP, T, NF and K, R-plasmids that were present in these strains were between 15 and 6.9 kbp; *V. furnissii* strains were resistant to CF, AMP, T, NF, CB and K with R-plasmids between 15 and 6.6 kbp. In the same manner, the collection of strains had resistance to the antibiotics mentioned above. All collected strains had R-plasmids between 25 and 7 kbp. Of the strains that grew in agar blood 87.5% had R-plasmids, of different molecular weights in the range of 25 to 6.6 kbp, 30% of these were 7 kbp long (Figure 5).

Vibrio strains that were cured of their plasmids with acridine orange and spread in agar blood grew without causing any type of hemolysis. Strains, not withstanding the *Vibrio* species in question, after having been spread in Möeller and Hinton agar, after plasmid treatment, did not show inhibition halos for any of the antibiotics that were used (Figure 6). In

cepas pertenecientes a ambos géneros *Aeromonas* y *Vibrios*. Esta técnica se aplicó a 60 cepas identificadas previamente como *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis* o *Vibrio furnissii*, con el API tanto 20-E como 20N-E y pruebas bioquímicas complementarias, coincidiendo la identificación de los géneros en 59 de los casos, sólo la cepa 131 identificada previamente como *A. hydrophila* no coincidió.

La técnica de PCR se hizo con cepas de colección (ya mencionadas) que también dieron identificación correcta con ambas técnicas (Figuras 1 y 2).

El 97% de las cepas, *A. hydrophila, V. fluvialis* y *V. furnissii*, crecieron en agar sangre, formando una zona verdosa-parduzca alrededor de la colonia (Figura 3).

Se replicó experimentalmente el cuadro clínico de la infección que mostraron los peces cultivados en las granjas y de los cuales se aislaron las cepas.

El cuadro clínico causado por *V. fluvialis* se caracterizó por nerviosismo en la mayoría de los individuos inoculados, aletas hemorrágicas y replegadas, boqueo en la superficie de los acuarios, vientre abultado, mucosidad excesiva sobre la superficie del cuerpo. Después de efectuar la necropsia a los individuos que murieron, se observó hemorragia interna generalizada en todos los órganos internos.

El cuadro clínico presentado por los individuos inoculados con *V. furnissii* mostró, en general, la misma semiótica que el patógeno anterior, con la diferencia de que en este caso se registró también hemorragia en globo ocular de los individuos inoculados.

Se presentaron halos de inhibición para los antibióticos cefalotina, tetraciclina, nefilmecina, ampicilina, carbecilina, kanamicina, cefaxantina, nitrofurantoína, ceftriaxina (Figura 4).

Las cepas de la especie *A. hydrophila* presentaron resistencia a los antibióticos CF, T, NF, AMP, CB y K, con plásmidos-R entre los intervalos de 25.7 bp-

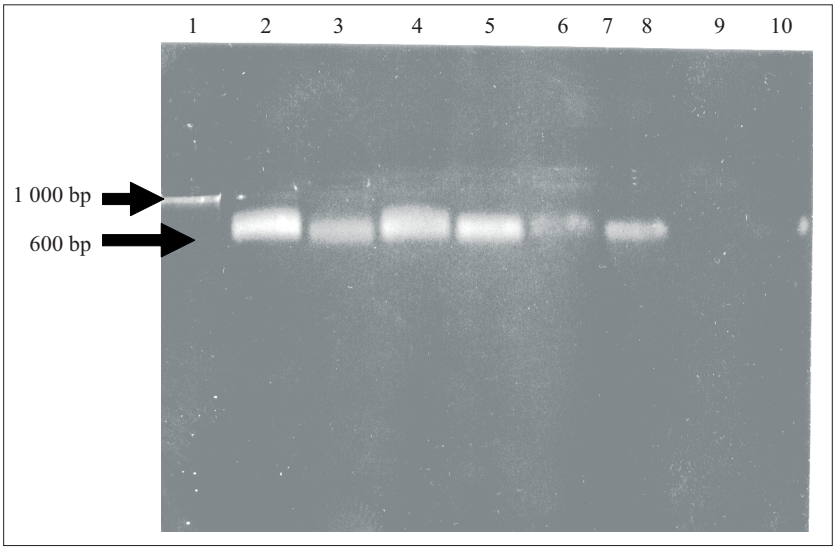

Figura 1. Gel de agarosa al 1%. Pozo 1, marcador de 1 000 pb. En Vitrogen. Pozos 2 a 9, cepas silvestres, pozo 10, cepa de colección *Vibrio alginolyticus*. Producto de PCR con peso molecular de 600 pb. Oligonucleótidos Aer8 y Aer9 (Khan y Cerniglia, 1997).

Figure 1. Agarose gel at 1%. Well 1, 1 000 bp marker. In Vitrogen. Welles 2-9, wild strains; well 10, strain collection *Vibrio alginolyticus*. PCR product with molecular weight of 600 bp. Aer8 and Aer9 oligonucleotides (Khan y Cerniglia, 1997).

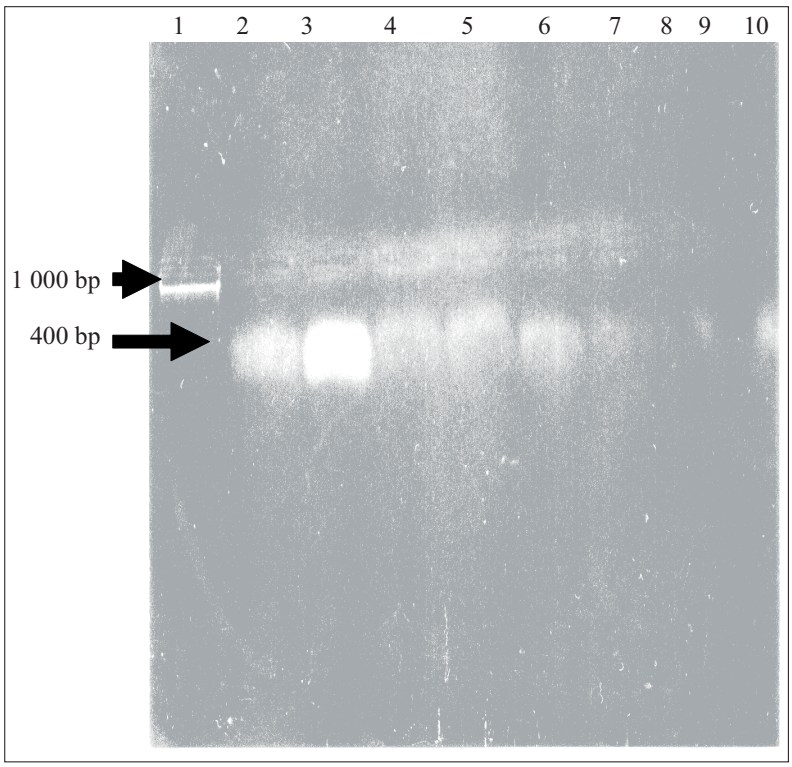

Figura 2. Gel de agarosa al 1%. Pozo 1, marcador de 1 000 pb. Fermentas. Pozos 2- 9, cepas silvestres; pozo 10, cepa de colección *Aeromonas hydrophila*. Producto de PCR con peso molecular de 400 pb. Oligonucleótidos Vib1 y Vib2 (Zanetti *et al.,* 1992).

Figure 2. Agarose gel at 1%. Well 1, 1 000 bp marker. Ferments. Welles 2-9, wild strains; well 10, strain colection *Aeromonas hydrophila*. PCR product with molecular weight of 400 bp. Vib1 and Vib2 Oligonucleotides (Zanetti *et al.*, 1992).

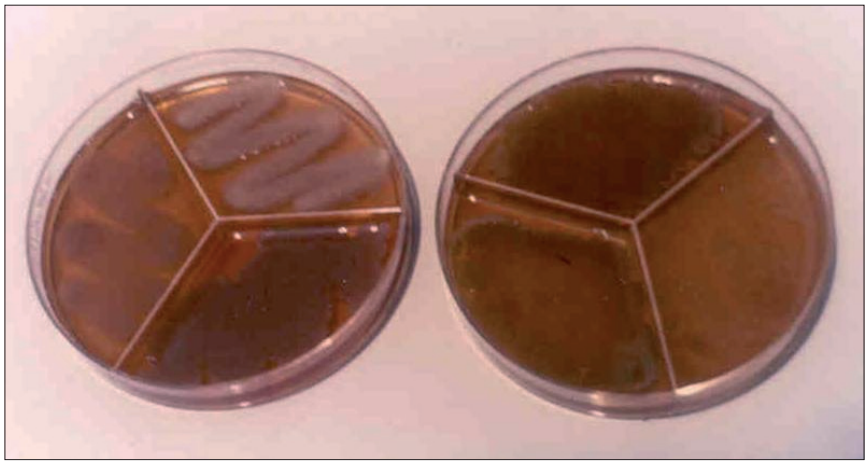

Figura 3. Crecimiento en agar sangre.

Figure 3. Growth on blood agar.

the same manner, none of these strains showed the presence of plasmids in the agarose gels after having been exposed to acridine-orange (Figure 7).

Discussion

Aeromonas and *Vibrio* families form a part of a complex group of pathogens in humans, as well as in different aquatic species, either in the wild or in aquatic farms. Therefore, it is important that studies of etiology, as well as epidemiology be carried out for these species in order to establish whether some of their phenotype characteristics may be related to virulence.

Some biochemical, enzymatic and cellular properties have been described as potential indicators

6.6bp; las cepas de *V. fluvialis* presentaron resistencia a CF, AMP, T, NF, K, los plásmidos-R presentes en estas cepas registraron intervalos entre 15 bp-6.9 bp; finalmente las cepas de *V. furnissii* fueron resistentes a CF, AMP, T, NF, CB y K con plásmidos-R de pb entre los intervalos 15-6.6 pb. Las cepas de colección igualmente presentaron resistencia para los antibióticos mencionados, todas las cepas de colección portaron plásmidos-R de 25-7 pb. El 87.5% de las cepas con crecimiento en agar sangre portaron plásmidos-R, de diferentes pesos moleculares entre los rangos 25-6.6 kb, 30% de éstos son de 7 bp (Figura 5).

Las cepas de los vibrios que fueron sometidas a curación de plásmido con naranja de acridina, y posteriormente sembradas en agar sangre, crecieron

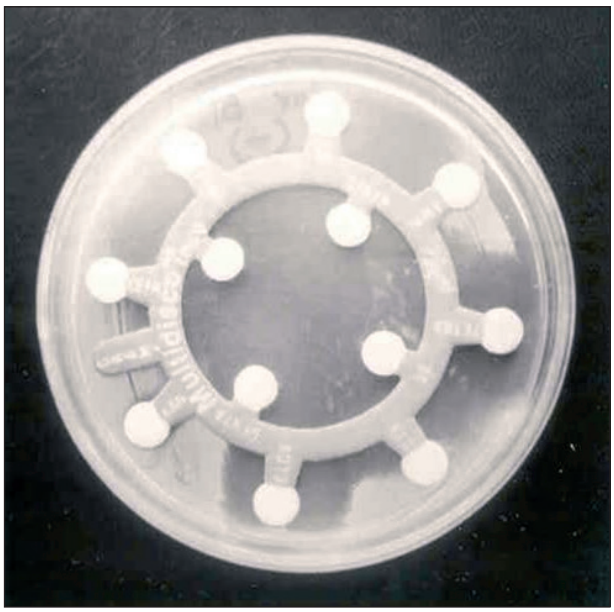

Figura 4. Resistencia a antibióticos (Multidiscos, Sanofi).

Figure 4. Antibiotic resistance (Multidisk, Sanofi).

of virulence in *Aeromonas* strains: Hsu *et al.*;[32] Kaper *et al.;*[33] Wakabayashi and Joseph;[34] Turbull *et al.;*[35] Morgan *et al.*;[36] and Angka[37] report that virulent strains of *A. hydrophila* obtained from ulcer tissue of catfish have hemolysis genes that are capable, *in vitro*, of causing lysis of erythrocytes of several animal species. This hemolytic activity was established in this study for *V. fluvialis* and *V. furnissii* strains, that when spread in agar blood, formed brownish-green zones surrounding the bacterial colonies, indicating a loss of potassium due to the α-hemolytic activity of the strains.

Results of this study with *V. fluvialis* and *V. furnissii* strains isolated from infected *C. auratus* fish clearly demonstrated their capacity to cause pathogenicity and virulence effects when injected intramuscularly at different doses into healthy *C. auratus* fishes.[23] Signs and lesions that were obtained experimentally replicated those that were recorded during the original infection, both strains corresponding to an ulcerative mionecrosis syndrome and hemorrhagic septicemia as reported by Roberts[9] for infections caused by *Aeromonas* and *Vibrio*.

It has been demonstrated in *V. anguillarum* that a PJM1-type plasmid of 25-65 kbp is needed to codify the virulence component system (Crosa *et al.,*[7,38]). Experiments by Wiik *et al.,*[39] on infections by *A. salmonicida*, indicate that if virulence is mediated by plasmids, then plasmid 24 MDa is important. Furthermore, in this study we found that virulent strains *V. fluvialis* and *V. furnissii* had plasmids that

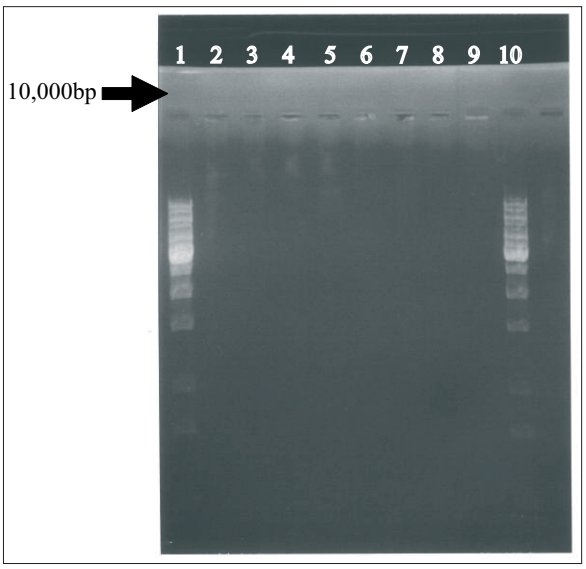

Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Pozos 1 y 10 marcado de peso molecular Fermentas de 10 000 pb. Pozos 2-9, plásmidos-R extraídos de diferentes cepas de *Vibrio fluvialis, Vibrio furnissi* y *Aeromonas hydrophila.*

Figure 5. Electrophoresis in agarose gel at 1%. Wells 1 and 10, molecular weight marker. Ferments of 10 000 bp. Wells 2-9, plasmids-R obtained from different strains of *Vibrio fluvialis, Vibrio furnissi* and *Aeromonas hydrophila.*

en agar sangre sin presentar ningún tipo de hemólisis. Las cepas, indistintamente de la especie de *Vibrio* de que se tratara, después de ser sembradas en agar de Möeller y Hinton, posterior a la curación de los plásmidos, no presentaron halos de inhibición para ningún antibiótico (Figura 6). Asimismo, ninguna de estas cepas registró presencia de plásmido en la corrida de gel de agarosa efectuada después de su exposición en naranja de acridina (Figura 7).

Discusión

Las familias de las *Aeromonas* y de los *Vibrios* integran un grupo complejo de patógenos tanto para el humano como para diferentes especies acuáticas, tanto de vida natural como en cultivo. Por tanto, es importante efectuar estudios tanto de etiología como de epidemiología de estas especies para establecer si algunas de sus características fenotípicas pueden ser relacionadas con la virulencia.

Algunas propiedades bioquímicas, enzimáticas y celulares han sido descritas como indicadores potenciales de la virulencia en cepas de *Aeromonas*: Hsu *et al.*;[32] Kaper *et al.*;[33] Wakabayashi y Joseph;[34] Turnbull *et al.*;[35] Morgan *et al.*;[36] y Angka[37] informan que cepas virulentas de *A. hydrophila* obtenidas de tejido ulcerado de pez gato poseen genes de hemólisis

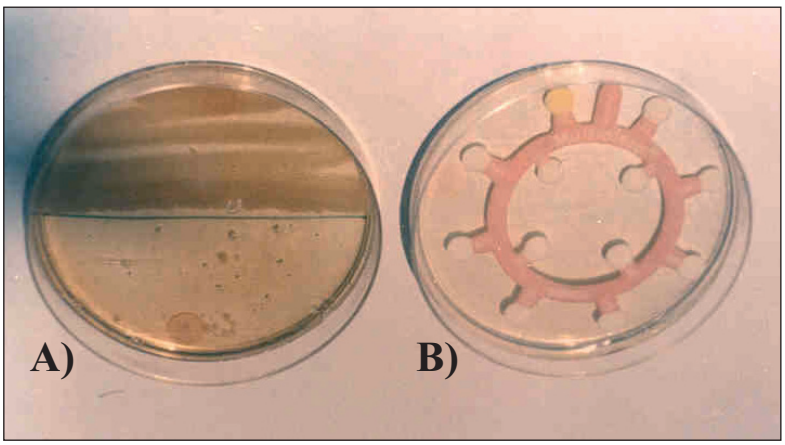

Figura 6. A) Crecimiento comparativo en agar sangre antes y después de tratar los plásmidos con naranja de acridina. B) Sensibilidad a antibióticos después de curación de plásmidos.

Figure 6. A) Comparative growth in blood agar before and after treating the plasmids with acridine orange. B) Antibiotic sensibility after treating plasmids.

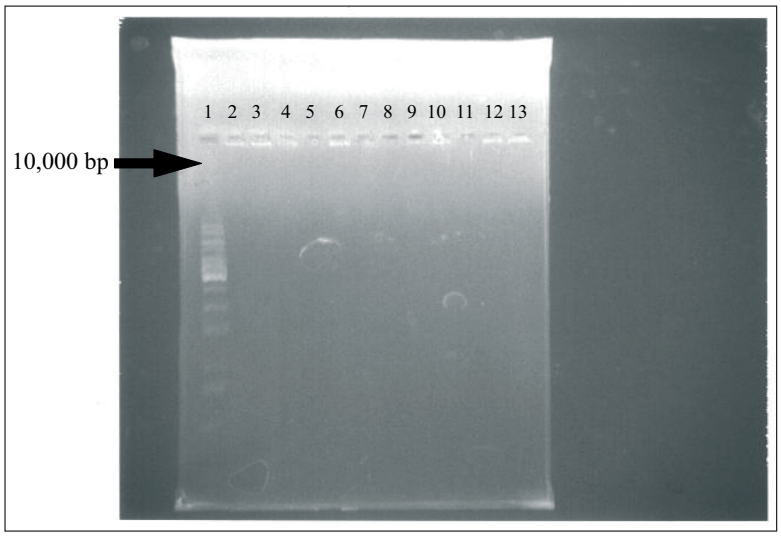

Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Pozo 1, marcador de peso molecular de 10 000 pb. Pozos 2-13 ADN de diferentes cepas de *Vibrio fluvialis, Vibrio furnissi* y *Aeromonas hydrophila.*

Figure 7. Electrophoresis in agarose gel at 1%. Wells 1, molecular weight marker of 10 000 bp. Wells 2-13, DNA of different strains of *Vibrio fluvialis, Vibrio furnissi* and *Aeromonas hydrophila.*

ranged between 15 kbp and 6.6 kbp while the Aeromonas group strains that were analyzed had 25.7 kbp R-plasmids. We also found that strains that were plasmid carriers had resistance to the following antibiotics: cephalothin, ceftriaxone, cefotaxime, carbenicillin, kanamycin, tetracycline, and ampicillin, these last three are commonly used in aquaculture.

The relationship between the presence of plasmids and α-hemolytic capacity of both *Vibrio* species, understood as a virulence factor,[5] was confirmed when hemolysis disappeared when the strains went through a plasmid treatment process, since the strains that expelled their plasmids did not grow in blood agar or did not cause hemolysis. Also, these strains did not have inhibition halos when the antibiosis study was performed for all the antibiotics mentioned above.

Referencias

1. Negrete R P, Romero J J. Estudio cualitativo de las condiciones sanitarias de producción y manejo de

que son capaces, *in vitro*, de lisar glóbulos rojos de varias especies de animales. Esta actividad hemolítica se logró establecer en el presente estudio para las cepas de *V. fluvialis* y *V. furnissii*, que, al ser sembradas en agar sangre, formaron zonas verdosas-parduzcas alrededor de las colonias bacterianas, indicando pérdida de potasio por la actividad α-hemolítica de las cepas.

Los resultados del presente estudio con cepas de *V. fluvialis* y *V. furnissii* aisladas de peces infectados de *C. auratus* demostraron claramente capacidad de efectos de patogenicidad y virulencia por inyección intramuscular de diferentes dosis de los patógenos problemas en peces sanos de *C. auratus.*[23] Los signos y lesiones obtenidos experimentalmente replicaron a los que se registraron en la infección original, correspondiendo en ambas cepas a un síndrome mionecrosis ulcerativa y septicemia hemorrágica registrada por Roberts[9] para infecciones provocadas por *Aeromonas* y *Vibrios.*

En *V. anguillarum* se ha demostrado el requerimiento de un plásmido PJM1 de 25-65 kbp para codificar el sistema que el componente de la

virulencia (Crosa *et al.*[7,38]); asimismo, experimentos sobre infecciones bacterianas realizados por Wiik *et al.*[39] en *A. salmonicida*, indican que si la virulencia está mediada por plásmidos, el plásmido de 24 MDa es importante. También en el presente estudio se encontró que las cepas virulentas de *V. fluvialis* y *V. furnissii* portaban plásmidos con rangos entre 15 kbp a 6.6 kbp y que las cepas del grupo de las *Aeromonas* analizadas portaron plásmidos-R de 25.7 kbp. Se encontró, además, que las cepas portadoras de éstos, presentaron resistencia a cefalotina, cetriaxina, cefataxina, carbecilina, kanamicina, tetraciclina y ampicilina, estos tres últimos de uso común en la acuicultura.

La relación entre la presencia de plásmidos y la capacidad α-hemolítica de ambas especies bacterianas de *Vibrio*, entendida como factor de virulencia,[5] fue confirmada al desaparecer la capacidad de hemólisis de las cepas que pasaron por el proceso de curación de plásmidos, ya que las cepas que expulsaron los plásmidos no crecieron en agar sangre o bien no presentaron hemólisis, además de que estas cepas tampoco presentaron halos de inhibición al efectuarse nuevamente el estudio de antibiograma para todos los antibióticos mencionados.

granjas acuícolas en los estados de México y Morelos. Rev Hidrobiol 1998; 8: 43-54.

2. Lee J V, Shread P, Furniss A I, Bryant T N. Taxonomy and description of *Vibrio fluvialis* sp. Nov. (Synonym. Group F. *Vibrios* EF6) J Appl Bacteriol 1981; 50: 73-94.
3. Brenner D J, Hickman-Brenner F W, Lee J V, Steigerwalt A G, Fannining G R, Hollis G G, *et al. Vibrio furnissii* (formerly aerogenic biogroup of *Vibrio fluvialis*), a new species isolated from human feces and the enviroment. J Clin Microbiol 1983; 18: 816-824.
4. Toranzo A E, Barja J L, Colwell R R, Hetrick F L. Relatioship between plasmid strain of *Vibrio anguillarum* isolated from different fish species. Appl Environ Microbiol 1983; 55: 826-831.
5. Madigan T M, Martinko M J, Parker J. Biología de los microorganismos. Madrid: Prentice Hall, 2000.
6. Toranzo A E, Barja L. Virulence factors of bacteria pathogenic for coldwater fish. Annu Rev Fish Dis 1993; 3:5-36.
7. Crosa J H, Schiewe M H, Falkow S. Evidence for plasmid contribution to the virulence of the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. Infet Immun 1987; 18: 509-513.
8. Crosa J H, Hodges L L, Schiewe M. Curing of plasmid is correlated with attenuation of virulence in marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. Infect Immun 1980; 27: 897-902.
9. Roberts R J. Introduction fish. In: Inglis W, Roberts R J, Bromage R N, editore Bacterial diseases of fish. London: Academic Press,1993; 1-20.
10. Austin B, Austin D A. Bacterial fish pathogen diseases in formed and wild fish. London, England: Ellis Horwood Ltd. 1987.
11. Munro A L S. The pathogenesis of bacterial diseases of fishes. En: Robert R-J, editor. Microbiol disease of fishes. London: Academic Press 1982; 131-149.
12. ANALYTICAL PROFILE INDEX.API-20E Enterobacteriaceae and other Gram-negative Bacteria. 4nd ed. France: BioMerioux, 1997.
13. ANALYTICAL PROFILE INDEX. API-20NE Enterobacteriaceae and other Gram negative Bacteria 2nd ed. France: BioMerioux, 1989.
14. Dalsgaard I, Gudmundsdottir B K, Helgason S, Hoie S, Thoresen O F. Identification of atypical *Aeromonas salmonicida*: inter-laboratory evaluation and harmonization of methods. J Appl Microbiol 1998, 84: 999-1006.
15. Altewegg M, Steigerwalt A G, Altewegg-Bissig R, Iuthy-Hottenstein J, Brenner DJ. Biochemical identification of *Aeromonas* Genospecies isolated from humans. Am Soc Microbiol 1990; 28:258-264.
16. Colwell R R, McDonell M T, De Ley J. Proposal to recognize the family Aeromonadaceae. Fam Nov Int J Sys Bacteriol 1986; 36:473-477.
17. Furniss A L, Lee J V, Donovan T S. Group F, a new *vibrio*? Lancet II,1977;1: 565-566.
18. Cowan S T. Cowan and Steel´s Manual for the identification of medical bacteria. 2nd ed. Cambridge:Cambridge University Press,1974.
19. Khan A, Cerniglia C E. Rapid and sensitive method for the detection of *Aeromonas caviae* and *Aeromonas trota* by polymerase chain reaction. Rev Aquacult 1977; 24:233-239.
20. Zanetti S, Deriu A, Dupre I, Snaguinetti M, Tadda G, Sechi L A. Differentiation of *Vibrio alginolyticus*. Strain isolated from sardina aters by ribotyping and new rapid PCR Fingerprinting method. Appl Environ Micorbiol 1999;5:1871-1875.
21. Bradshaw L J. Laboratory Microbiology. 2nd ed. Philadelphia: W B Saunders Company, 1973.
22. APHA Standard Methods for examination of water and wastewater. Washington D.C: American Publication Healthy Association, 1992; 583-589.
23. Negrete R P, Romero J J M. Capacidad de *Vibrio fluvialis* (Lee, 1981) de producir enfermedad en pez dorado (*Carassius auratus*, L.). Vet Méx 2003;35:31-43
24. Michel C. A standardized of experimental furunculosis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) Can J Fish Aquac Sci 1980;37: 746-750.
25. Bauer A W, Kirby W M M, Sherris J C, Turk M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized singl-disc method. Am J Clin Pathol 1966,45:493-496.
26. Hindler J. Antimicrobial susceptibility testing.In: Iseberg H D, editor. Clinical Microbiology procedures Handbook. Washington D. C: American Socciety Microbiology 1992.
27. Barry A I. Thornsberry C. Susceptibility test difusion procedures. In: Lennette, editor. Manual of Clinical Microbiology. Washington: American Socciety Microbiology 1985.
28. Giono C S. Prueba de Bauer-Kirby para sensibilidad a los antimicrobianos. Infectología III 1983; 7:325.

29. Stanley R S. Lynch´s Medical Laboratory Technology. Washington USA: WB. Saunders, 1983; 434-440.
30. Birnboim H C, Dolly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl Acid Res 1979;7: 1513-1517.
31. Gene RulerTM MBIFermentas.Ikb.DNA Ladder. Current Protocols in Molecular Bilogy. In: Ausubel F M, *et al.*, editor. New York, Brooklyn: John Wiley & Sons, Inc, 1997; 1.
32. Hsu T C, Waltman W D, Shotts E B. Correlation of extracellular enzimatic activity and biochemical characteristic with regard to virulence of *Aeromonas hydrophila*. Develop Biol Stand 1981;49:101-111.
33. Kaper J B, Lockman H, Colwell. *Aeromonas hydrophila*. Asian Fish Sci 1990;3: 343-351.
34. Wakabayashi R R, Joseph S W. *Aeromonas hydrophila*. Ecology and toxigenicity of isolates from a estuary. J Appl Bacteriol 1981;50:350-377.
35. Turbull P C B, Lee J V, Miliotis M D, Van de Walle S, Koornhof H J, Jeffer L, *et al*. Enteroticin production in relation to taxonomic grouping and source of isolation of *Aeromonas* species. J Clin Microbiol 1984, 19: 175-180.
36. Morgan D R, Johnson P C, Du Pont H L, Satterwithe T K, Wood L V. Lack of correlation between known virulence properties of *Aeromonas hydrophila* and enteropathogenicity for human . Infect Immun 1985; 50: 62-67.
37. Angka S L. The pathology of the walking catfish *Clarias batracius* (L.)infected intraperitoneally with *Aeromonas salmonicida*. J Fish Biol 1985; 15:189-195.
38. Crosa J H, Actis L A, Mitoma Y, Perez-Casal J, Tolmasky M E, Valvano M A. Plasmid- mediated iron sequestering systems in pathogenic strains of *Vibrio anguillarum* and *Escherichia coli*. In: Helinski D R, Cohen C, Clewell D, Jackson C, Hollaender A, editors. Plasmid in bacteria. New York: Plenum press, 1989.
39. Wiik R, Hoff K A, Andersen K, Daae F L. Relationships between plasmids and phenotypes of presumtive strains of *Vibrio anguillarum* isolated from different fish species. Apply Environ Microbiol 1989;55: 826-831.