



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS Y FORESTALES

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ÁREA: BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

TESIS DOCTORAL:

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Aeromonas* spp. AISLADAS DE
GRANJAS TRUTÍCOLAS Y OBTENCIÓN DE BACTERIÓFAGOS PARA SU
CONTROL BIOLÓGICO”**

QUE PRESENTA:

M.C. MARÍA ANEL FUENTES VALENCIA

Como requisito para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

COMITÉ DE TUTORES:

DR. JUAN JOSÉ VALDEZ ALARCÓN

DR. CARLOS ANTONIO MARTÍNEZ PALACIOS

DRA. MARÍA CRISTINA CHÁVEZ SÁNCHEZ

DRA. PAMELA NAVARRETE RAMÍREZ

DRA. LUCIANA RAGGI HOYOS

Morelia Michoacán, Julio de 2023.

DEDICATORIA

A mis padres **GUADALUPE VALENCIA ROBLES** y **FRANCISCO FUENTES AMALLA** por el amor incondicional que me brindan. Quienes siempre son mi apoyo en todo momento. Les agradezco la valentía para impulsarme en todos mis sueños y hacerme llegar donde estoy. ¡Mis héroes, los amo!. Finalmente obtengo mis estudios de Doctora y eso es un triunfo de su infinito amor. Espero volver pronto mucho de lo que me han ayudado.

A la familia hermosa **AMILLANO FUENTES** que formé durante mi Doctorado junto con **MATEO**, familia que es mi faro de alegría, nene gracias por ser mi refugio inmediato, gracias por el profundo amor que nos tienes. Iniciamos juntos dos de nuestros sueños: el Doctorado y formar una familia, ¡esto nos hizo más fuertes!

ISABELLA, sé que algún día leerás: *eres el SUEÑO Y REGALO más hermoso que la vida me otorgó, así como el motor de fortaleza para que siga cumpliendo contigo mis sueños más anhelados.*

HIJA TE AMO MI HERMOSA ISABELLA AMILLANO FUENTES

AGRADECIMIENTOS

Tengo muchos aspectos que agradecer infinitamente a la vida por ayudarme en la configuración de un núcleo que ayudó a que hoy en día este culminando el Doctorado, que pensé difícil lograr por lo retos de la Pandemia y de salud que se presentaron. Sé que mis palabras no alcanzarán para agradecerle a la vida lo afortunada que he sido durante mi formación del Doctorado. **¡Estoy cumpliendo dos de mis sueños y eso lo celebraré siempre!.**

A **Dios**, quien mi madre me ha dicho “siempre te cuida, estes donde estes hija mía”.

A mi toda mi familia **Fuentes Valencia** por el apoyo para el cuidado de mi hija, particularmente a mi hermana **Marbella** quien la cuido con mucho esmero para que pudiéramos asistir a nuestras actividades del Doctorado ¡muchas gracias hermana!.

A mis sobrinas **Melissa y Belén Fuentes** por el amor de hermanas hacia mi hija, gracias por cuidarla durante nuestros estudios.

A mi tías **Iris y Amelia** por alentarme a seguir superándome y brindarme cariño siempre aún a la distancia.

A la **Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH)**, mi querida Universidad me encantó formar parte de los Nicolaitas desde la preparatoria. Por brindarme las instalaciones para la realización de la presente investigación, por siempre te llevaré: *“Cuna de héroes, crisol de pensadores”*.

A mi Director de tesis el **Dr. Juan José Valdéz**, un gran Maestro, gracias por su paciencia, por las miles de preguntas que tenía para realizarle sobre la parte académica. Por la confianza de recibirme como estudiante de Doctorado y darme consejos cuando me sentía triste por alguna situación académica o personal; por brindarme muchos consejos de vida para que mi formación durante el Doctorado fuera lo más integral posible. Así es, tengo muchos aspectos que agradecerle al Dr. Juan José, por ser comprensivo con los tiempos de mi maternidad durante el Doctorado, por todo eso le estoy infinitamente agradecida, de formar parte del equipo del Laboratorio de Epidemiología Molecular y Biotecnología de Enfermedades

Infecciosas (LEMBEI) del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CMEB).

A mi Codirector de tesis el **Dr. Carlos Antonio Martínez** quien me descubrió para iniciar mis estudios desde la Maestría. Llegué insegura, ya que era un reto para mí el retomar el campo de investigación, el platicar con usted me hizo ver que un gran líder del área confiaba en mí y por supuesto que eso me llenó de seguridad. Muchos aprendizajes desde mis inicios en la investigación. Por ayudarme a mejorar mis habilidades analíticas y de investigación. Así como ayudarme para el bienestar de mi familia nuclear. Gracias por ser comprensivo para los tiempos de Padres durante el Doctorado.

Para mis **Directores de tesis**, un honor formar parte de su guía, nunca dejo de aprender con ambos.

A la **Dra. Cristina Chávez**, quien desde la Maestría me apoyo infinitamente. Me siento agradecida eternamente con usted, una gran persona a quien admiro, no solo por el ejemplo de Investigadora que es en el campo acuícola, sino por el gran cariño que tiene para todos sus estudiantes.

A la **Dra. Pamela Navarrete** y **Dra. Lucina Raggi**, quienes me apoyaron en todo momento con mi maternidad y de consejos para el bienestar de mi hija. Al ser mamá durante el Doctorado los desafíos incrementaron, pero su apoyo y confianza me ayudaron para superarlos de manera rápida, con el compartir de esos tips de Madres-Investigadoras.

A todo **MI COMITÉ TUTORAL** por la guía, análisis y revisión de la presente investigación, por ayudarme a mejorar mis habilidades de Investigación. Sin duda alguna, un gran reto en la presente investigación, por el tiempo de pandemia que se presentó, en donde me ayudaron a persistir para la búsqueda de los tremendos bacteriófagos. Grato contar con un gran equipo de Investigadores líderes en su campo ¡Muchas gracias Comité Tutorial!

Durante la presente investigación tuve la oportunidad de formar equipo desde 2018 con “**Aeromonitas**” como solíamos llamarnos, todos ellos con entrega y entusiasmo apoyaron en trabajo de campo y laboratorio. Entre todos compartimos nuestros conocimientos de investigación y de vida. Especial agradecimiento y reconocimiento

para mis amigos: **Abril, Diego, Ricardo Alexis, Maira, Pepe, Jorge, Carlos, Aurora y Oscar.**

A mis compañeros del CMEB por hacer más divertida la estancia y de aprendizaje juntos: **Carolina, María, Karla, Adriana, Marco, Fernando y Francisco.**

Al **Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT)** por la beca que se me otorgó para mis estudios del Doctorado, muchas gracias por el apoyo.

A las instancias de la **UMSNH-SENASICA-CESAMICH, A.C.** por el financiamiento y la colaboración para el desarrollo de la presente investigación. Profundo agradecimiento al **Comité Estatal de Sanidad e Inocuidad Acuícola de Michoacán (CESAMICH, A.C.)** particularmente al **Gerente: Biól. José Luis Contreras** por su gran compromiso con la vinculación del sector productivo acuícola de Michoacán con el de investigación. Por su ayuda, amistad y confianza para que continuara la investigación acuícola que tanto me agrada.

A mis estimados amigos del **CESAMICH: Eréndira, Odin, Erik, Crispín, Omar y Miguel** gracias por su apoyo y el compartir sus experiencias. Gracias por apoyarme cuando estaba embarazada para los muestreos, me dio gusto su compañerismo y amistad que seguramente perdurará para siempre. ¡Infinitas gracias!.

Al **Centro Regional de Investigación Acuícola y Pesquera (CRIAP) Pátzcuaro** particularmente al **Jefe: M. en C. Andrés Ausencio Arellano** por la colaboración en la presente investigación.

A la **Secretaria del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas Liliana Cerritos** por el apoyo enorme durante mis estudios del Doctorado. Un gusto conocerte. Siempre recordaré tu amabilidad.

A mis amistades **Evelia, Amparo, Eva, Lola y Sibi**, quienes me escucharon y brindaron una amistad sincera para la calma de mi espíritu ajetreado del día a día.

CONTENIDO

	Página
I. RESUMEN GENERAL.....	1
II. ABSTRACT.....	2
III. INTRODUCCIÓN.....	3
IV. HIPOTÉISIS.....	9
V. OBJETIVOS.....	10
VI. RESULTADOS.....	11
A) CAPÍTULO 1.....	11
RESUMEN.....	12
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUCCIÓN.....	14
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
2.1. Selección de las granjas a muestrear.....	18
2.2. Aislamiento e identificación molecular de <i>Aeromonas</i> spp.	18
2.3. Análisis filogenéticos de las secuencias de <i>rpoD</i>	19
2.4. Análisis epidemiológico.....	20
2.5. Calidad de agua en las granjas trutícolas Michoacanas.....	20
2.6. Evaluación del grado de cumplimiento de	
Buenas prácticas de producción acuícola (BPPA).....	22
2.7. Resistencia bacteriana a los antibióticos.....	23
3. RESULTADOS.....	24
3.1. Distribución de las <i>Aeromonas</i> spp.	24
3.2. Análisis filogenético.....	28
3.3. Identificación de los factores asociados con <i>Aeromonas</i> spp.....	29
3.4. Calidad de agua en las granjas trutícolas Michoacanas.....	31
3.5 Evaluación del grado de cumplimiento de Buenas	
prácticas de producción acuícola (BPPA)	35
3.6. Perfiles de susceptibilidad antimicrobiana.....	38
4. DISCUSIÓN.....	41
5. CONCLUSIONES.....	52

6. LITERATURA CITADA.....	53
ARTÍCULO CIENTÍFICO.....	69
B) CAPÍTULO 2.....	81
RESUMEN.....	81
ABSTRACT.....	82
1. INTRODUCCIÓN.....	83
1.1. Características generales de los Bacteriófagos y ciclos replicativos.....	84
1.2. Fagoterapia, ventajas y desventajas.....	88
1.3. Uso de la fagoterapia en la piscicultura.....	92
1.3.1. Antecedentes de la fagoterapia en la piscicultura.....	92
1.3.2. Fagoterapia para el control de infecciones por <i>Aeromonas</i> spp. en peces.....	93
1.3.3. Fagoterapia para el control de infecciones por <i>Plesiomonas shigelloides</i> en peces.....	95
1.4. Potencial de las enzimas líticas de los bacteriófagos.....	96
2. JUSTIFICACIÓN.....	100
3. HIPOTÉISIS.....	101
4. OBJETIVOS.....	102
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	103
5.1 Bacterias hospederas para el aislamiento de los bacteriófagos.....	103
5.2. Sitios de muestreo para el aislamiento de los bacteriófagos.....	104
5.3. Enriquecimiento de muestras de agua para los aislamientos de los bacteriófagos.....	104
5.4. Detección de los bacteriófagos.....	105
6. RESULTADOS.....	107
6.1 Aislamiento de los bacteriófagos contra <i>Aeromonas</i> spp. y <i>Plesiomonas shigelloides</i>	107
7. DISCUSIÓN.....	113
8. CONCLUSIONES.....	117
9. LITERATURA CITADA	118

VII. DISCUSIÓN GENERAL.....	137
VIII. CONCLUSIONES GENERALES.....	142
IX. PERSPECTIVAS GENERALES.....	143
X. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA.....	144
XI. ANEXOS.....	154
ANEXO 1. Encuestas para la granja acuícola estudio epidemiológico <i>Aeromonas</i> spp.	
ANEXO 2. Factores neutros de la granja y trabajador	
ANEXO 3. Evaluación de las granjas en BPPA	
ANEXO 4. Perfiles de susceptibilidad antimicrobiana	
ANEXO 5. Análisis de costos para el establecimiento de la fagoterapia	
ANEXO 6. Artículo de divulgación	

LISTA DE FIGURAS:

CAPÍTULO 1

	Página
Figura 1 Árbol filogenético basado en las secuencias del gen <i>rpoD</i> de las <i>Aeromonas</i> spp. de dos especies de truchas y <i>Aeromonas</i> spp. de referencia	29
Figura 2 Perfil de resistencia antimicrobiana de las especies bacterianas aisladas de la trucha arco iris	40

CAPÍTULO 2

	Página
Figura 1 Complejo de lisis de los bacteriófagos líticos	86
Figura 2 Placas de los bacteriófagos en el agar de doble capa	110

LISTA DE TABLAS

CAPÍTULO 1

	Página
Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos y sus especificaciones para el cultivo de la trucha arco iris	21
Tabla 2. Prevalencia de especies identificadas en 64 granjas trutícolas de Michoacán	24
Tabla 3. Prevalencia de <i>Aeromonas</i> spp. por regiones	25
Tabla 4. Frecuencia de <i>Aeromonas</i> spp. por peces positivos	25
Tabla 5. Frecuencia de <i>Aeromonas</i> spp. por peces analizados	27
Tabla 6. Factores de riesgo y protección asociados a la presencia de <i>Aeromonas</i> spp. en las granjas trutícolas	30
Tabla 7. Categorías de parámetros fisicoquímicos por granja	32
Tabla 8. Calidad de agua por parámetro	34
Tabla 9. Grado de cumplimiento por granja trutícola	36
Tabla 10. Perfil de resistencia antimicrobiana de las especies bacterianas de la trucha arco iris para distintas clases de antibióticos	38

CAPÍTULO 2

	Página
Tabla 1. Comparación entre la terapia antibiótica y la terapia bacteriofágica	88
Tabla 2. Fagoterapia para el control de infecciones por <i>Aeromonas</i> spp. en peces	94
Tabla 3. Ejemplos de aplicaciones de los enzibióticos	97
Tabla 4. Genes de enzimas líticas identificadas en	

	Página
fagos de <i>Aeromonas</i> spp.	98
Tabla 5. Bacterias procedentes de granjas trutícolas	
de Michoacán utilizadas para el aislamiento de los bacteriófagos	103
Tabla 6. Sitios de muestreos con bacteriófagos	107
Tabla 7. Bacteriófagos obtenidos en las diluciones	108
Tabla 8. Bacteriófagos por bacterias hospederas	111
Tabla 9. Concentraciones de los bacteriófagos líticos	112

ANEXOS

	Página
ANEXO 1. Encuestas para la granja	
acuícola estudio epidemiológico <i>Aeromonas</i> spp.	154
ANEXO 2. Factores asociados a la presencia de	
<i>Aeromonas</i> spp. en las granjas trutícolas	160
ANEXO 3. Evaluación de las granjas en BPPA	165
ANEXO 4. Perfiles de susceptibilidad antimicrobiana	170
ANEXO 5. Análisis de costos para el establecimiento de la fagoterapia	184
ANEXO 6. Artículo de divulgación	189

I. RESUMEN GENERAL

La acuicultura es el sector de producción animal con más rápido crecimiento, se estima que en un futuro suministrará la mayor parte de las proteínas alimentarias de origen marino y dulceacuícola. No obstante, las enfermedades de tipo bacteriano causan pérdidas significativas durante los cultivos. Entre las enfermedades bacterianas más comunes en el cultivo de peces de agua dulce a nivel mundial, son identificadas las *Aeromonas* spp. Para su tratamiento se emplean antibióticos administrados en el alimento, lo que resulta ineficaz por la pérdida de apetito en los peces. La fagoterapia como una alternativa, se basa en el uso de los virus bacteriófagos o fagos, predadores naturales de las bacterias para el tratamiento de las infecciones bacterianas. Esta terapia presenta numerosas ventajas ambientales y terapéuticas, en comparación al empleo tradicional de antibióticos. En México falta aún evaluar su uso potencial para la piscicultura. Con el objetivo de hacer frente a la crisis mundial debida a la contaminación por los antibióticos y alcanzar una acuicultura sustentable, se plantean alternativas de biocontrol, como el uso de la fagoterapia. En el presente estudio se identificaron molecularmente diferentes especies de *Aeromonas* de granjas trutícolas, así como los factores de riesgo-protección asociados con la presencia de dichas bacterias. Además se obtuvieron los perfiles de resistencia antimicrobiana y se cuenta actualmente con una colección de bacteriófagos, para el biocontrol de cepas epidemiológicamente relevantes de *Aeromonas* spp. y *Plesiomonas shigelloides* en granjas trutícolas de Michoacán. Para el aislamiento de los bacteriófagos se colectaron muestras del medio acuático y se utilizaron 10 cepas de *Aeromonas* spp. y una de *P. shigelloides* del estudio epidemiológico previo como hospederos. Finalmente se obtuvieron un total de 56 bacteriófagos contra *Aeromonas* spp. y *P. shigelloides*, de estos 5 bacteriófagos líticos son candidatos para el biocontrol de *Aeromonas* spp. en la piscicultura de México.

Palabras clave. Fagoterapia, biocontrol, acuicultura, resistencia antimicrobiana, epidemiología.

II. ABSTRACT

Aquaculture is the fastest-growing animal production sector, it is estimated that in the future, it will supply most of the food proteins of freshwater and marine origin. However, diseases cause significant production losses in aquaculture systems. One of the most common diseases in freshwater fish farming worldwide is caused by *Aeromonas* spp. For its treatment, antibiotics are used, which are ineffective due to the loss of appetite of sick fish. Phage therapy is based on using viruses, natural predators of bacteria, “bacteriophages or phages” to treat of bacterial infections. This therapy has numerous environmental and therapeutic advantages compared to the traditional use of antibiotics. In Mexico, its potential for fish farming has not yet been evaluated. To face the world crisis due to antibiotic contamination and achieve sustainable aquaculture, biocontrol alternatives are proposed, such as phage therapy. In this study, *Aeromonas* spp. from trout farms were molecularly identified, as well as the risk-protection factors associated with the presence of these bacteria. In addition, antimicrobial resistance profiles were obtained, and a collection of bacteriophages for the biocontrol of epidemiologically relevant strains of *Aeromonas* spp. and *Plesiomonas shigelloides* in trout farms in Michoacan was obtained. Samples were collected from the aquatic environment to isolate bacteriophages, and ten strains of *Aeromonas* spp. and one of *P. shigelloides* from the previous epidemiological study were used as hosts. Finally, 56 bacteriophages against *Aeromonas* spp. and *P. shigelloides* were isolated, from which five lytic bacteriophages are candidates for the biocontrol of *Aeromonas* in fish farming in Mexico.

Keywords: Phage therapy, biocontrol, aquaculture, antimicrobial resistance, epidemiology.

III. INTRODUCCIÓN

Las bacterias del género *Aeromonas* son ubicuas en la naturaleza, particularmente en el ambiente acuático (Ryan *et al.*, 2017). Dichas bacterias son capaces de colonizar rápidamente y causar infecciones oportunistas en sus hospederos (Lamy *et al.*, 2021). En los humanos, la infección por *Aeromonas* spp. se presenta en personas con sistema inmunodeprimido. Se considera que las especies de *Aeromonas* son patógenos entéricos humanos emergentes. Sin embargo, se carece de un análisis sistemático de la infección por especies de *Aeromonas* en la gastroenteritis humana en comparación con otros patógenos bacterianos entéricos. Estudios recientes reportan a las *Aeromonas* como el tercer género bacteriano patógeno como responsable de la gastroenteritis humana en Australia durante un período de cuatro años, precedido de otros géneros bacterianos como *Campylobacter* y *Salmonella* (Yuwono *et al.*, 2021). Asimismo, en investigaciones realizadas en Taiwán sobre aislamientos de *Aeromonas* procedentes de pescados a la venta en los mercados y de *Aeromonas* de pacientes, mostraron que las especies de *Aeromonas* causantes de enfermedades clínicas, tales como *A. dhakensis*, *A. hydrophila*, *A. veronii* y *A. caviae*, pueden aislarse también de los pescados y comparten propiedades de virulencia, así como perfiles de resistencia antimicrobiana similares con los aislados de origen humano (Wu *et al.*, 2019).

Las infecciones en los peces y animales marinos por *Aeromonas* generalmente se presentan bajo condiciones de estrés asociadas a las prácticas inadecuadas en el cultivo (Gonçalves *et al.*, 2019). Al menos ocho especies de *Aeromonas* móviles patógenas, entre ellas *A. hydrophila*, *A. veronii*, *A. jandaei*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. bestiarum*, *A. dhakensis* y *A. schubertii* son responsables de pérdidas económicas importantes en la acuicultura mundial, ya que durante los brotes infecciosos causaron mortalidades significativas (Dien *et al.*, 2022). Particularmente en los salmónidos las *Aeromonas* spp. causan mortalidades altas (Fečkaninová *et al.*, 2017; Fuentes *et al.*, 2022) e incluso mortalidades masivas en los cíclidos (Shayo *et al.*, 2012; Assane *et al.*, 2021). Otra bacteria acuática que se asocia a la piscicultura comercial es *Plesiomonas shigelloides*, la cual es de forma bacilar, Gram- negativa y

oxidasa positivo, perteneciente a grupo de Enterobacterias (Janda *et al.*, 2016). En conjunto con los miembros del género *Aeromonas* y *Fusobacterium mortiferum*, se indican como las bacterias más comunes del tracto intestinal de algunos peces dulceacuícolas como son de los órdenes: perciformes (*Micropterus salmoides* y *Lepomis macrochirus*); siluriformes (*Hypostomus auroguttatus*, *Ictalurus punctatus*, *Pimelodus maculatus*) y del orden Characiforme (*Prochilodus argenteus*) (Silva *et al.*, 2005; Duarte *et al.*, 2014; Larsen *et al.*, 2014). No obstante, en la trucha arco iris, *Plesiomonas shigelloides* provocó un brote con una mortalidad alta del 40% en peces adultos de 1-2 años de edad, los cuales se observaron delgados, débiles y presentaron ano prominente con exudado amarillento. Internamente los peces presentaron petequias y ascitis (Cruz *et al.*, 1986). Asimismo, en la carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idellus*), los peces con infección mostraron erosión muscular (Hu *et al.*, 2014). En la carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*), la bacteria ocasionó un 60% de mortalidad y externamente los peces enfermos se observaron con exoftalmia y con manchas difusas hemorrágicas (Behera *et al.*, 2018). Incluso *P. shigelloides* en los cíclidos ornamentales resultó ser letal ya que se causó el 100% de mortalidad (Nisha *et al.*, 2014). Por lo que las pérdidas de producción relacionadas con las enfermedades, son indeseables para cualquier industria acuícola, no sólo por los impactos económicos, sino además por los efectos ambientales negativos y facilitar la transmisión de las enfermedades a otros sistemas acuícolas (Pincinato *et al.*, 2021). También la industria de los peces ornamentales es impactada por las *Aeromonas* spp., particularmente por *A. hydrophila* que se aísla frecuentemente. En consecuencia Malasia, que es el principal productor y exportador mundial de peces ornamentales, intensifica los esfuerzos mediante la aplicación del Programa de Transformación Económica y otras medidas de bioseguridad para abordar los problemas de la acuicultura (Anjur *et al.*, 2021).

Recientemente se considera que las *Aeromonas* se encuentran en la interfaz entre los componentes de “Una sola salud”, ya que son capaces de promover los intercambios genéticos de resistencia a los antibióticos, entre las bacterias asociadas a humanos, a los animales y el ambiente (Lamy *et al.*, 2021). La resistencia a los antibióticos de microorganismos patógenos asociados a la acuicultura es de gran

interés en la salud humana. Se reconoce al ambiente acuático como una de las principales fuentes de microorganismos resistentes a los antimicrobianos, entre ellos las fluoroquinolonas y las tetraciclinas, las cuales persisten en el ambiente por períodos largos de tiempo (Pereira *et al.*, 2015; Changotra *et al.*, 2022).

El uso frecuente de los alimentos suplementados con antibióticos en la piscicultura, para reducir los brotes de las enfermedades y manejo de las infecciones, proporciona una presión selectiva muy peligrosa para la salud humana. Dicha presión forma reservorios bacterianos multirresistentes a los medicamentos y favorece la selección de genes de resistencia, los cuales son transferibles hacia los patógenos de los peces y hacia otras bacterias del medio acuático, por lo que la terapia antibiótica resulta ineficaz, lo que dificulta el control de las infecciones bacterianas (Heuer *et al.*, 2009; Ture *et al.*, 2022).

Las bacterias presentan distintas estrategias de resistencia a los antibióticos. Entre ellas se incluye la transferencia vertical de genes, es decir, la transmisión de la información genética modificada que se localiza en el cromosoma bacteriano a las generaciones siguientes y la transferencia horizontal de genes (HGT), la cual es mediada por los elementos genéticos móviles, como los plásmidos, transposones, integrones y los bacteriófagos (Pazda *et al.*, 2019). En las bacterias Gram negativas dependiendo del tipo de antibiótico, pueden observarse cuatro mecanismos principales de la resistencia antimicrobiana: la inactivación enzimática del fármaco, modificación del lugar de acción del antibiótico y la eliminación activa del antibiótico de la célula bacteriana mediante una bomba de eflujo (expulsión); así como el desarrollo de una ruta alternativa que realice una función similar o idéntica a la de la vía inactivada por el fármaco o limitar la necesidad de la célula de los metabolitos producidos en la vía que se inhibió. Dichos mecanismos pueden ser propios de los microorganismos (innatos) o adquiridos a partir de otros microorganismos (Reygaert, 2018; Pazda *et al.*, 2019).

Los reportes de multirresistencia a los antibióticos en bacterias procedentes de la piscicultura comercial, se incrementaron en los últimos 10 años y se identificó que el 50% de las bacterias aisladas presentaron multirresistencia antimicrobiana. Entre las especies bacterianas patógenas, que presentaron una resistencia mayor al esquema

de antibióticos que se evaluó, se encuentran las *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia cloacae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas luteola*, *Yersinia ruckeri* y *Vibrio anguillarum* (Capkin *et al.*, 2017). Las estimaciones recientes proyectan que, de continuar con el uso frecuente de los antibióticos en la acuicultura, para el 2030 se incrementa hasta el 33% del consumo global de los antibióticos (Dien *et al.*, 2022). La liberación de los antibióticos en el medio ambiente, puede tener graves repercusiones ecológicas ya que hasta el 90% de estos antibióticos se excretan sin cambios (Pereira *et al.*, 2015), dichos residuos pueden contaminar el ambiente acuático, las aguas superficiales, subterráneas y los sedimentos (Heuer *et al.*, 2009), así como afectar el desarrollo de los microorganismos, animales, plantas y humanos. La exposición crónica a los antibióticos es un problema de salud pública, ya que puede tener un efecto generacional, debido a que se reportan un total de 34 antibióticos típicos en muestras de orina de tres generaciones de familias diferentes de China, que incluye a los padres, nietos y abuelos que comparten el mismo hogar (Zhang *et al.*, 2020; Sosa *et al.*, 2021). Con el objetivo de hacer frente a la crisis mundial debida a la contaminación por los antibióticos y con ello alcanzar una acuicultura sustentable, se plantean alternativas de control como es el caso de la fagoterapia.

La fagoterapia se basa en el uso de los virus, predadores naturales de las bacterias (bacteriófagos o fagos) para el tratamiento de las infecciones bacterianas, los cuales infectan y destruyen a las bacterias para el caso de los bacteriófagos de ciclo lítico (Catalao *et al.*, 2013; Dien *et al.*, 2022). El interés en el uso de los bacteriófagos para el control de enfermedades es cada vez mayor principalmente debido al incremento de las bacterias resistentes a varios tipos de antibióticos en los distintos sectores de producción animal. Aunque la terapia con bacteriófagos no cuenta con autorización para su uso global, ya existen formulaciones comerciales de bacteriófagos para la industria alimentaria (Fuentes *et al.*, 2021). La fagoterapia presenta numerosas ventajas en comparación al empleo tradicional de los antibióticos. Los bacteriófagos son ubicuos en el medio ambiente, diversos, económicos e inofensivos para los animales y específicos a sus bacterias hospedadoras (Ruchi *et al.*, 2014, Carvalho *et al.*, 2017; Fuentes *et al.*, 2021). Se considera que el fácil aislamiento de fagos nuevos

contra los patógenos bacterianos resistentes o nuevos permite una adecuada selección de bacteriofagos para el control de bacterias patógenas. Incluso la fagoterapia resultaría especialmente útil en la camaronicultura, ya que los camarones carecen de un sistema inmunológico específico y, por tanto, no pueden beneficiarse de las vacunas (Culot *et al.*, 2019).

En la última década existe un interés en las endolisinas derivadas de los bacteriófagos, las cuales son enzimas líticas capaces de hidrolizar de manera específica, la pared celular de peptidoglicano, desde el interior y el exterior de los patógenos bacterianos (Barrera *et al.*, 2015; Murray *et al.*, 2021; Rahman *et al.*, 2022). Dichas enzimas presentan una acción selectiva que permite distinguir un solo agente patógeno de una cohorte de bacterias y evita la eliminación innecesaria de los comensales (Murray *et al.*, 2021). Asimismo, las endolisinas son de acción rápida y de bajo riesgo para el desarrollo de resistencias bacterianas, por lo que se considera que las endolisinas se encuentran entre los mejores agentes terapéuticos alternativos para tratar a bacterias multirresistentes (Rahman *et al.*, 2022). Las endolisinas son consideradas como enzibióticos debido a que son enzimas hidrolíticas de la pared celular bacteriana y tienen un efecto letal sobre las bacterias. Aunque la terapia con las endolisinas aún se encuentra en fases de investigación, algunas empresas de Europa y América, iniciaron con la utilización de productos comerciales basados en endolisinas para la salud humana (Murray *et al.*, 2021).

La mayoría de las investigaciones sobre la fagoterapia en la acuicultura global, se dirigen principalmente para tres patógenos bacterianos como *Vibrio* spp., *Flavobacterium* spp. y *Aeromonas* spp. y se localizan principalmente en Asia (Culot *et al.*, 2019). Para el caso de México, son escasas las investigaciones de la fagoterapia para su aplicación en la acuicultura, al momento se reportan para la camaronicultura en el biocontrol de *Vibrio parahaemolyticus* (Lomelí y Martínez, 2014; Makarov *et al.*, 2019). Otra ventaja de la fagoterapia es su versatilidad en las vías de aplicación para la acuicultura. Se ha evaluado su efectividad con las administraciones directamente en el agua de cultivo, por inmersión, inyección

(intramuscular e intraperitoneal) en los peces e incorporación en el alimento (Silva *et al.*, 2016; Culot *et al.*, 2019; Kunttu *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2021; Donati *et al.*, 2022).

Por las numerosas ventajas reportadas de la fagoterapia, el objetivo de la presente investigación fue obtener una colección de bacteriófagos para el biocontrol de cepas epidemiológicamente relevantes de *Aeromonas* spp. en granjas trutícolas de Michoacán.

IV. HIPOTÉISIS

Los bacteriófagos aislados a partir del medio acuático son útiles para el biocontrol de cepas epidemiológicamente relevantes de *Aeromonas* spp. y *Plesiomonas shigelloides* en granjas trutícolas de Michoacán.

V. OBJETIVOS:

GENERAL

- Obtener una colección de bacteriófagos para el biocontrol de cepas epidemiológicamente relevantes de *Aeromonas* spp. en granjas trutícolas de Michoacán.

PARTICULARES

- Identificar la prevalencia y los factores de riesgo asociados con *Aeromonas* spp. procedentes de cultivos de la trucha arco iris en Michoacán, México.
- Determinar los perfiles de resistencia antimicrobiana de las especies bacterianas.
- Aislar y caracterizar los bacteriófagos a partir de muestras de agua.
- Evaluar la efectividad *in vitro* de los bacteriófagos en cepas epidemiológicamente relevantes de *Aeromonas* spp. y *Plesiomonas shigelloides*.

VI. RESULTADOS

A) CAPÍTULO 1:

PREVALENCIA, PERFIL DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS Y FACTORES DE RIESGO Y PROTECCIÓN ASOCIADOS CON *Aeromonas* spp. EN EL CULTIVO DE LA TRUCHA ARCO IRIS (*Oncorhynchus mykiss*) EN MICHOACÁN, MÉXICO.

Highlights

- Prevalencia del 70% de *Aeromonas* spp. en las granjas de trucha arco iris del Estado Michoacán, mayor a la reportada en el 2010 (49% nacional, 4% en Michoacán).
- Se aislaron *Aeromonas* spp. (94.5%) y otras especies de bacterias como *Serratia fonticola* (3.6%), *Pseudomonas* spp. (0.9%) y *Plesiomonas shigelloides* (0.9%).
- *Aeromonas sobria* fue la especie con mayor prevalencia en el cultivo de la trucha.
- Primer reporte de *Aeromonas rivipollensis*, *Aeromonas finlandiensis* y *Serratia fonticola* en granjas trutícolas.
- Se identificaron como factor de riesgo, la presencia de gallinas en la granja y como factor protector el desecho de los residuos biológicos fuera de la granja asociados a la presencia de *Aeromonas* spp.

Palabras clave:

Aeromonas, *Serratia*, epidemiología, resistencia antimicrobiana.

RESUMEN

La trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) es uno de los principales productos de la acuicultura con valor en el comercio mundial. Una de las enfermedades bacterianas más comunes en el cultivo de peces es producida por las *Aeromonas* spp. Los objetivos del presente estudio fueron identificar la prevalencia, factores de riesgo y protección asociados con la presencia de *Aeromonas* spp. en granjas trutícolas de Michoacán, así como obtener los perfiles de resistencia antimicrobiana. Se colectaron peces y sedimentos de 64 granjas de trucha arco iris. Para la identificación de las especies bacterianas se amplificó y secuenció el gen *rpoD*, asimismo, se realizó un análisis sobre las variables de riesgo con el software EpiInfo. En las granjas trutícolas se identificó una prevalencia del 70% de *Aeromonas* spp., se obtuvieron un total de 110 aislamientos bacterianos, de los cuales 104 corresponden para *Aeromonas* spp. (95%), también se aislaron *Serratia fonticola* 4/110 (4%) y *Pseudomonas* spp. 1/110 (1%). Se reporta por primera vez la presencia de *Aeromonas rivipollensis*, *Aeromonas finlandiensis* y *Serratia fonticola* en las granjas trutícolas. Se requiere la mejora de las medidas de bioseguridad, ya que se identificó como factor de riesgo la presencia de gallinas en la granja y como factor protector el desecho de residuos biológicos fuera de la granja. En los perfiles de resistencia antimicrobiana se detectaron bacterias resistentes para los 21 antibióticos que se evaluaron, principalmente para los antibióticos betalactámicos del tipo penicilina, tal como la Ampicilina-sulbactam, Amoxicilina-ácido Clavulánico y la Piperacilina-Tazobactam del 97%, 72% y 56% respectivamente. Además para la Cefazolina, una Cefalosporina de primera generación, el 78% de los aislamientos procedentes de las instalaciones piscícolas presentaron resistencia. La frecuencia y el tipo de resistencias encontradas sugieren que la adquisición de determinantes de resistencia antimicrobiana puede provenir de otras bacterias del entorno e indica la necesidad inmediata de estrategias nuevas para el manejo de las infecciones bacterianas en la piscicultura.

ABSTRACT

Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is one of the leading aquaculture products with a value in world trade. One of the most common bacterial diseases in fish farming is produced by *Aeromonas* spp. This study aimed to identify the prevalence, risk, and protection factors associated with the presence of *Aeromonas* spp. in trout farms in Michoacán. Antimicrobial resistance profiles were also obtained. Fish and sediments were collected from 64 rainbow trout farms. The *rpoD* gene was amplified and sequenced to identify bacterial species. An analysis of the risk variables was also carried out with the EpiInfo software. A prevalence of 70% of *Aeromonas* spp. was identified in the trout farms, and 110 bacterial isolates were obtained, of which 104 correspond to *Aeromonas* spp. (95%), *Serratia fonticola* 4/110 (4%) and *Pseudomonas* spp. 1/110 (1%) were also isolated. The presence of *Aeromonas rivipollensis*, *Aeromonas finlandiensis* and *Serratia fonticola* are reported for the first time in trout farms. Improved biosecurity measures are required, as some risk factors, such as keeping chickens and off-farm biowaste disposal as protective factors, were identified. In the antimicrobial resistance profiles, resistant bacteria were detected for the 21 antibiotics evaluated. These antimicrobial resistances mainly for beta-lactam antibiotics of the penicillin type, such as Ampicillin-sulbactam, Amoxicillin-Clavulanic acid, and Piperacillin-Tazobactam were 97%, 72% and 56%, respectively. In addition, for a first-generation cephalosporin, Cefazolin, 78% of the isolates from the fish production systems showed resistance. The frequency and antimicrobial resistance reported suggest that the acquisition of antimicrobial resistance determinants may come from other environmental bacteria. This indicates the immediate need for new strategies to control bacterial infections in fish farming.

1.- INTRODUCCIÓN

Las enfermedades bacterianas representan una limitante para el cultivo de peces dulceacuícolas de importancia comercial ya que se estima que causan el 50% de las pérdidas en la producción (Assefa y Abunna, 2018). Una de las enfermedades bacterianas más comunes en la piscicultura a nivel mundial es producida por *Aeromonas* spp. (Mzula *et al.*, 2019). Los miembros del género *Aeromonas* son bacilos Gram- negativos (Janda y Abbot, 2010), habitantes naturales de diferentes ambientes acuáticos tales como los dulceacuícolas, marinos y salobres (Hossain y Heo, 2020). Las *Aeromonas* spp. se dividen en dos grupos de acuerdo a sus características morfológicas y las condiciones para su crecimiento óptimo (Janda y Abbot, 2010). La mayoría de las *Aeromonas* spp. son móviles y mesófilas, por otro lado están las especies no móviles las cuales se desarrollan en condiciones psicrófilas (Horneman y Ali, 2011). La composición estructural de la célula bacteriana tiene una gran influencia en el proceso infeccioso (Pessoa *et al.*, 2019). Como otras Proteobacterias, las *Aeromonas* presentan un sistema flagelar dual (polares y laterales) responsables de su motilidad, codificados por diferentes genes estructurales y reguladores; por ejemplo en *A. hydrophila* se reportan un grupo completo de genes flagelares laterales que contiene 38 genes (Wilhelms *et al.*, 2009; Noonin *et al.*, 2010; Beaz y Figueras, 2013). Estudios confirman que todas las *Aeromonas* producen un flagelo polar, que permite a las bacterias nadar en ambientes líquidos (Wilhelms *et al.*, 2009). Cuando las bacterias crecen en medios o superficies viscosas, desarrollan múltiples flagelos laterales que mejoran su adherencia y la formación de biopelículas, tal es el caso de *Aeromonas hydrophila* (Canals *et al.*, 2006; Noonin *et al.*, 2010). Los flagelos además de desempeñar funciones relacionadas con la adhesión celular también favorecen la formación de biopelículas y la persistencia durante el proceso infeccioso (Liu, 2015). Recientemente se identificó que la movilidad natatoria de los aislados clínicos de *Aeromonas* spp. es inferior en comparación a la de aislados ambientales; sin embargo, la capacidad de formación de biopelículas es mayor en aislados clínicos de *Aeromonas* (Miyagi *et al.*, 2023). Además las *Aeromonas* presentan otras características estructurales (por ejemplo, pili, cápsulas, capas S, lipopolisacáridos y

proteínas de la membrana externa) que contribuyen a su movilidad y supervivencia. Asimismo, secretan diversas toxinas, enzimas y otros productos que mejoran su invasión de las células huésped y la evasión de la respuesta inmunitaria del huésped (Noonin *et al.*, 2010; Liu, 2015).

También es frecuente el aislamiento de *Aeromonas* a partir de diferentes productos alimenticios como: la carne de pollo, leche, vegetales y en los mariscos (Praveen *et al.*, 2016; Stratev y Odeyemi, 2016; Lee *et al.*, 2020). La identificación de las *Aeromonas* a nivel especie se considera compleja y problemática debido a su heterogeneidad fenotípica y genotípica (Puthucheary *et al.*, 2012). El uso de los genes de mantenimiento y metabolismo primario es ampliamente utilizado para la identificación de las especies bacterianas que no se identifican a través de las técnicas bioquímicas y moleculares tradicionales (Duman *et al.*, 2018). Dichos genes codifican para las proteínas con funciones esenciales para la sobrevivencia bacteriana. Los genes *gyrB* y el *rpoD*, se consideran una herramienta fiable y estándar para la identificación correcta de las especies dentro de este género (Fernández y Figueras, 2020).

Al momento se reportan un total de 36 especies de *Aeromonas* (Fernández y Figueras, 2020) las cuales pueden actuar como patógenos primarios y/u oportunistas de los animales acuáticos y terrestres (Janda y Abbot, 2010; Chang *et al.*, 2019; Jung *et al.*, 2019) incluyendo el ser humano. El género *Aeromonas* también es responsable de infecciones intestinales y extraintestinales en el humano (Praveen *et al.*, 2016). Del total de *Aeromonas* spp., 12 se reportan patógenas de peces (Austin y Austin, 2012; Zepeda *et al.*, 2017; Austin, 2019). Entre los signos clínicos causados por las infecciones de *Aeromonas* spp. en los peces se encuentran úlceras cutáneas, pérdidas de escamas, exoftalmia, hemorragias en la superficie corporal y la distensión abdominal (Dong *et al.*, 2017; Hossain y Heo, 2020; Salem *et al.*, 2020; Azzam *et al.*, 2021; Fuentes *et al.*, 2022). Dichas infecciones causan mortalidades de hasta el 90% en los salmónidos (Fečkaninová *et al.*, 2017; Fuentes *et al.*, 2022) e incluso mortalidades masivas en los cíclidos (Shayo *et al.*, 2021; Assane *et al.*, 2021). El estrés se considera uno de los factores predisponentes asociados con las

enfermedades bacterianas, originado principalmente por los cambios de la temperatura, calidad de agua inadecuada, altas densidades de cultivo y una nutrición deficiente, así como la manipulación brusca de los peces y la fertilización con estiércol (Lewbart, 2001; Goharrizi *et al.*, 2015; Wanja *et al.*, 2020; Azzam *et al.*, 2021). Investigaciones recientes en el cultivo de la tilapia, señalan que durante el verano, particularmente en junio y agosto, se presenta una prevalencia alta de *Aeromonas* móviles con mortalidades altas que podrían relacionarse con una calidad del agua inadecuada y con prácticas deficientes de producción acuícola como es el uso del estiércol de aves de corral sin un tratamiento previo. Asimismo, se reportan aislamientos de *Aeromonas* en muestras de peces y en el agua, con frecuencias del 33% y 13% respectivamente (El-Gohary *et al.*, 2020). Dentro de los factores de riesgo asociados con la prevalencia de *A. hydrophila* en las granjas de *Clarias gariepinus* en Nigeria, las cuales manejan estanques de cultivo de concreto o tierra, se reportan la edad de los organismos de 1-9 meses y peso de los mismos de 200-600g (Adah *et al.*, 2021). Otros factores asociados significativamente a dicha bacteria se encuentran el tamaño de la granja, donde a mayor superficie, el riesgo de un brote bacteriano es mayor; además el uso de sal a concentraciones inferiores de 135 ppm y la utilización compartida de las artes de pesca entre las granjas de bagres en los Estados Unidos, sin una previa desinfección de las mismas, lo que podría representar una forma de introducción bacteriana en los estanques (Bebak *et al.*, 2015). En particular, entre los parámetros de calidad de agua se encontró al amonio (>0.05 mg/l) como factor de riesgo significativamente asociado con *Aeromonas* spp. en las granjas de trucha arco iris de España (Ortega *et al.*, 1996). Por lo cual los productores requieren mejorar las prácticas de producción acuícola con el fin de disminuir el riesgo del desarrollo de la enfermedad (Bebak *et al.*, 2015; Azzam *et al.*, 2021). En la piscicultura comercial de diferentes países se reporta la prevalencia de *Aeromonas* spp. tal es el caso en granjas de trucha arco iris en España con una prevalencia del 20% (Ortega *et al.*, 1996). Duman *et al.*, (2018), emplearon el gen *gyrB* para identificar 90 aislamientos de *Aeromonas* procedentes de granjas de trucha arco iris en Turquía, los cuales corresponden a 10 especies: *A. sobria*, *A. salmonicida*, *A. media*, *Aeromonas* sp. (*A. molluscorum* o *A. diversa*), *A. veronii*, *A.*

bestiarum, *A. hydrophila*, *A. encheleia*, *A. dhakensis*, *A. hydrophila* subsp. *hydrophila*. En las granjas de trucha arco iris en siete estados de México se reportan *Aeromonas* spp. como el género predominante encontrado en el 49% de los aislamientos bacterianos, con la identificación de dos especies (*A. hydrophila* y *A. salmonicida*) mediante métodos bioquímicos estandarizados. En particular para Michoacán en el análisis de 21 granjas trutícolas se reportó a *Aeromonas* spp. y *A. hydrophila* con el 4% y 1% de frecuencia respectivamente (Salgado *et al.*, 2010). En otro estudio en México se realizó la identificación de las *Aeromonas* spp. con el uso de herramientas moleculares a través de la amplificación de dos genes que se consideran de mantenimiento y metabolismo primario como son el *gyrB* y el *rpoD*, se identificaron 10 *Aeromonas* spp. con las siguientes prevalencias: *A. veronii* (29.2%), *A. bestiarum* (20.8%), *A. hydrophila* (16.7%), *A. sobria* (10.4%), *A. media* (8.3%), *A. popoffii* (6.2%), *A. allosaccharophila* (2.1%), *A. caviae* (2.1%), *A. salmonicida* (2.1%) y *Aeromonas lusitana* (2.1%) (Vega *et al.*, 2014).

La trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) es uno de los principales productos de la acuicultura con valor en el comercio mundial ya que, junto con el salmón, representaron el 18.4% del valor de todos los productos acuáticos exportados en el 2020 (FAO, 2022). Particularmente, en México por su volumen se encuentra posicionada en el lugar 33 de la producción pesquera; sin embargo, por su valor la encontramos en el lugar 23. Michoacán es el tercer estado productor de trucha arco iris con una aportación del 15% a la producción nacional con 197 instalaciones trutícolas (CESAMICH, 2018; Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca, 2021).

A pesar de la información sobre el aislamiento y caracterización molecular de *Aeromonas* spp. aisladas de peces en diferentes países, existe poca información sobre los estudios epidemiológicos que permitan identificar factores de riesgo y /o protección asociados en las granjas de trucha arco iris. Por lo que el objetivo de la presente investigación es identificar la prevalencia, factores de riesgo asociados con *Aeromonas* spp. procedentes de cultivos de la trucha arco iris en Michoacán, México dada su importancia zoonótica.

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Selección de las granjas a muestrear

La selección de las granjas de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) se determinó por un muestreo aleatorio de distribución proporcional, en el que se consideraron las granjas presentes en microcuencas con más de tres granjas según datos del Comité Estatal de Sanidad e Inocuidad Acuícola de Michoacán (CESAMICH). Para la determinación del número de granjas representativas para muestreo, se utilizó el programa Win Epi de la Facultad de Veterinaria, de la Universidad de Zaragoza ©2006 con los siguientes parámetros: prevalencia esperada del 49% de *Aeromonas* (Salgado *et al.*, 2010), un error esperado del 10% y un nivel de confianza del 95%, con lo cual resultó un muestreo aleatorio de 57 granjas. Además se realizó un muestreo dirigido en siete unidades de cuarentena adicionales, por lo que se muestrearon 64 granjas en total. Adicionalmente se analizaron muestras de trucha dorada mexicana (*Oncorhynchus chrysogaster*) ya que se reportó en campo un brote sospechoso de *Aeromonas* spp. en una de las granjas de trucha arco iris muestreada. En la regionalización de las instalaciones acuícolas se consideraron las zonas establecidas previamente por el CESAMICH, de acuerdo a los criterios de cuencas hidrográficas, distribución municipal, ubicación de las instalaciones de trucha arco iris y las condiciones climáticas. Las seis regiones que se muestrearon son las Regiones Oriente Hidalgo y Zitácuaro con 25 y 24 instalaciones respectivamente; Región Centro-Pátzcuaro con siete instalaciones. Asimismo, las regiones de Uruapan, Huetamo y Centro-Morelia con cinco, dos y una granja de trucha arco iris muestreada respectivamente.

2.2 Aislamiento e identificación molecular de *Aeromonas* spp.

Para la detección de *Aeromonas* (Septicemia por *Aeromonas* móviles (MAS) y de *Aeromonas salmonicida*) el PROYECTO de Norma Oficial Mexicana NOM-020-PESC-1993, indica la colecta de al menos cinco peces moribundos de cada instalación de cultivo afectada; en ausencia de ejemplares moribundos, es suficiente la colecta de organismos muertos recientemente. Por lo que en el presente estudio,

se colectaron un total de seis peces de cada granja y en caso de ausencia de signos clínicos típicos de aeromoniasis también se muestrearon organismos. Los peces se transportaron dentro de hieleras en bolsas de plástico llenas con agua del estanque y oxígeno. Asimismo, se adicionó hielo para el transporte de los organismos vivos y se procesaron el mismo día de la colecta.

Se tomaron muestras de sedimentos de las mismas granjas en recipientes estériles. El aislamiento bacteriano de los peces se realizó conforme a lo descrito por Whitman, 2004 y se muestrearon asépticamente el hígado, bazo y riñón, órganos donde comúnmente suelen alojarse las *Aeromonas* spp. Se obtuvieron un total de 1287 muestras para aislamiento bacteriano. El cultivo primario se realizó en medio selectivo agar Glutamato rojo de fenol y almidón (GSP). Las colonias amarillas en agar GSP, que presentaron bacilos Gram-negativos y oxidasa-positivos se les realizaron pruebas de fermentación de glucosa y movilidad. Los aislamientos puros se almacenaron en agar infusión cerebro corazón (BHI) a -80°C con glicerol al 15%. Todos los aislamientos presuntivos de *Aeromonas* spp. se identificaron molecularmente, para lo cual un fragmento de aproximadamente 820 pb del gen *rpoD* se amplificó mediante PCR como se describe por Soler *et al.*, 2004. Los productos de PCR obtenidos se purificaron mediante el Kit QIAquick PCR Purification (Qiagen) y se enviaron a la empresa Macrogen (Korea) para su secuenciación por el método de Sanger. Las secuencias se ensamblaron mediante el programa DNA BASER v5.15 (Heracle Biosoft Romania, 2018) para obtener la secuencia consenso y se realizó la búsqueda de las secuencias similares en el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del National Center of Biotechnology (NCBI).

2.3 Análisis filogenéticos de las secuencias de *rpoD*

Las secuencias de *rpoD* se utilizaron para evaluar la relación filogenética de las *Aeromonas* spp., para lo cual se construyó un árbol de similitud de las secuencias mediante el software Molecular Evolutionary Genetics Analysis MEGA versión X (Kumar *et al.*, 2018). Asimismo, se incluyeron especies de referencia de la base de datos del NCBI en el alineamiento para determinar la distancia genética dentro y entre las especies bacterianas. La relación evolutiva se infirió utilizando el método de

vecino más cercano (Saitou y Nei, 1987). Los valores de confianza se estimaron con una prueba bootstrap con 1000 réplicas (Felsenstein, 1985) y las distancias evolutivas con el método de parámetros Kimura-2 (Kimura, 1980).

2.4 Análisis epidemiológico

Para la estimación de los riesgos asociados a la presencia de *Aeromonas* spp. se aplicó una encuesta estándar en cada instalación acuícola, la cual constó de 197 y 49 preguntas para la granja trutícola y el trabajador respectivamente (**Anexo 1**). La encuesta presentó predominantemente preguntas cerradas y cada entrevista duró aproximadamente 30 min. Dicha encuesta se contrastó con la presencia y/o ausencia de *Aeromonas* spp. en los peces, mediante el software Epi info™ versión 7.2.2.6 (CDC, 2018) para la construcción de los cuadros de contingencias, análisis de la razón de productos cruzados o razón de momios (RM) y la prueba estadística de Chi-cuadrado ($p < 0.05$). Para la interpretación de los resultados se consideró el valor de la razón de productos cruzados o razón de momios (RM) <1 indicaba asociación negativa por lo que se consideró un factor protector, valor de RM=1 no existe asociación entre la enfermedad y la exposición al factor; valor de RM >1 indicaba asociación positiva, el factor al que el individuo está expuesto es un factor de riesgo (Moreno *et al.*, 2000; Universidad de Zaragoza, 2006), además de la significancia estadística por la prueba de χ -cuadrada, corrección de Mantel y Haenszel ($p < 0.05$) que se calculó con el mismo software.

2.5 Calidad de agua en las granjas trutícolas Michoacanas

Se determinaron un total de 18 parámetros fisicoquímicos en el agua de las granjas para identificar si cumplen con las especificaciones para el cultivo de la trucha (**Tabla 1**). En campo se determinaron cuatro parámetros: pH, Oxígeno disuelto, temperatura y conductividad con el medidor multiparamétrico portátil HACH. Sin embargo, debido a una falla en el equipo no fue posible realizar las mediciones en algunas granjas. Otros 14 parámetros se determinaron en el Laboratorio de Calidad de Agua del CESAMICH, A.C. con las siguientes técnicas:

- Parámetros determinados por titulación: Dureza y Alcalinidad.
- Parámetros determinados a través de espectrofotometría (HACH DR 2700): Bario, zinc, cobre, manganeso, sulfatos, nitritos, nitratos, hierro y amonio.
- Los sólidos disueltos (SD) y sólidos suspendidos (SS) por gravimetría, los sólidos totales mediante SD+SS.

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos y sus especificaciones para el cultivo de la trucha arco iris

Número de prueba	Parámetro fisicoquímico	Especificaciones para la trucha	Referencia
1	Nitratos (mg/L)	<400	Timmons y Ebeling, 2010**
2	Sulfatos (mg/L)	<50	Timmons y Ebeling, 2010**
3	Cobre (mg/L)	<0.006	FAO, 2022*
4	Hierro (mg/L)	<1.0	FAO, 2022*
5	Bario (mg/L)	<5	Timmons y Ebeling, 2010**
6	Nitritos (mg/L)	<0.55	Klontz, 1991*
7	Manganeso (mg/L)	0.01	FAO, 2022*
8	Zinc (mg/L)	0.05	FAO, 2022*
9	Dureza (mg/L)	20-300	FAO, 2010**
10	Alcalinidad (mg/L)	10-400	FAO, 2022*

11	Oxígeno Disuelto (mg/L)^	6-9	Department of conservation, 2021
12	pH^	6.5-8.5	FAO, 2022*
13	Temperatura (°C) ^	12-21	FAO, 2022*
14	Sólidos Totales (mg/L)	0.0000-480	
15	Sólidos Suspendidos (mg/L)	0-80	Klontz, 1991*
16	Sólidos Disueltos (mg/L)	50-200	Klontz, 1991*
17	Conductividad (µmhos/cm)^	100-2000	Stone y Thomforde, 2004
18	Amonio (mg/L) Nitrógeno amoniacal total	<1	Timmons y Ebeling, 2010***

^Parámetro determinado en campo. *Especificaciones para la trucha

Especificaciones para la piscicultura *Requerimiento para peces de aguas frías.

Con base en las especificaciones para el cultivo de la trucha, las mediciones se establecieron en tres categorías: baja, óptima y alta, según los intervalos de los parámetros.

2.6 Evaluación del grado de cumplimiento de Buenas prácticas de producción acuícola (BPPA)

De la encuesta se consideraron 33 preguntas para revisar preliminarmente el grado de cumplimiento de las Buenas Prácticas de Producción Acuícola (BPPA), un porcentaje superior al 80 % se consideró con aprobación. La encuesta consideró aspectos sanitarios de las instalaciones acuícolas para identificar: la frecuencia de la limpieza y desinfección de estanquería, sistemas de desinfección en el acceso; el

protocolo para la eliminación de los desechos y la presencia de animales domésticos y/o silvestres en la instalación acuícola. Asimismo, la aplicación de la cuarentena a los organismos y si proporciona fármacos o sustancias químicas aprobados por la FDA, con la finalidad de identificar de forma preliminar las actividades destinadas a garantizar que los productos acuícolas mantengan las especificaciones de calidad sanitaria e inocuidad requeridas para el consumo humano y conservación del ambiente establecidas en las BPPA de la trucha en México (SENASICA-CIAD, 2003).

2.7 Resistencia bacteriana a los antibióticos

Las pruebas de sensibilidad antimicrobiana se realizaron por el método de difusión de disco y se interpretó con base en la guía del CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016 y 2021 (Manuales M45, M100; VET03 y VET04 para bacterias aisladas de animales acuáticos). En la prueba se evaluaron 21 antibióticos (μg): Amoxicilina - Ácido Clavulánico (20/10), Ampicilina-sulbactam (10/10), Piperacilina-Tazobactam (100/10), Cefazolina (30), Cefepima (30), Cefotaxima (30), Cefoxitina (30), Ceftazidima (30), Ceftriaxona (30), Cefuroxima sódica (30), Cloranfenicol (30), Aztreonam (30), Amikacina (30), Gentamicina (10), Tetraciclina (30), Ciprofloxacina (5), Levofloxacina (5), Sulfametoxazol-trimetoprima (1.25/23.75), Ertapenem (10), Imipenem (10) y Meropenem (10). Un cultivo bacteriano de 24 hrs procedente de caldo infusión de cerebro/corazón se ajustó a una absorbancia de 0.5-0.7 a una longitud de onda de 610 nm. El inóculo que se ajustó previamente se sembró por dispersión con un hisopo estéril en agar Mueller Hinton y se retó con los sensidiscos de la marca Oxoid. La medición de los halos de inhibición para cada antibiótico se realizó con un calibrador Vernier y se registró en milímetros.

3.- RESULTADOS

3.1 Distribución de las *Aeromonas* spp.

En las granjas de trucha arco iris se identificó una prevalencia del 70% de *Aeromonas* spp., de granjas trutícolas positivas para *Aeromonas* spp. en las muestras de peces y sedimentos fue del 36% y 47% respectivamente. Se obtuvieron un total de 110 aislamientos bacterianos a partir del análisis de 1289 muestras de peces y sedimentos. De los cuales 104 aislamientos corresponden para *Aeromonas* spp. (94.5%), también se aislaron otras especies de bacterias como *Serratia fonticola* 4/110 (3.6%), *Pseudomonas* spp. 1/110 (0.9%) y *Plesiomonas shigelloides* 1/110 (0.9%). Las bacterias más abundantes a partir de muestras de peces y sedimentos fueron *A. sobria* 31/104 (29.8%), *A. rivipollensis* 15/104 (14.4%) y *A. allosaccharophila* 14/104 (13.5%) (**Tabla 2**). Un aislamiento procedente de sedimento se asignó a nivel de género, ya que presentó el 91% de identidad y una homología de 814/896 nucleótidos con *Aeromonas* sp., la especie más cercana fue *Aeromonas rivipollensis* con valores bajos de identidad del 89% y de homología 849/950 (NCBI, 2020). En el caso sospechoso de infección por *Aeromonas* spp. en la trucha dorada se confirmó su presencia junto con *Plesiomonas shigelloides*.

Tabla 2. Prevalencia de especies identificadas en 64 granjas trutícolas de Michoacán

NÚMERO (%) ORIGEN DE AISLAMIENTOS							
<i>Aeromonas</i> spp.	Hospedero	Hígado (n=19)	Bazo (n=17)	Riñón (n=21)	Cutánea (n=4)	Total de aislamientos de peces (n= 61)	Total de aislamientos por GRANJAS (n=104)
<i>Aeromonas sobria</i>	Trucha arco iris/Trucha dorada mexicana	9 (29)	6 (19)	8 (26)		23 (37.7)	31 (29.8)
<i>Aeromonas rivipollensis</i>	Trucha arco iris	2 (19)		1 (6)		3 (4.9)	15 (14.4)
<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	Trucha arco iris	1 (7)	2 (14)	2 (14)	1 (7)	6 (9.8)	14 (13.5)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Trucha arco iris	3 (25)	1 (8)	2 (17)	2 (17)	8 (13.1)	12 (11.5)
<i>Aeromonas bestiarum</i>	Trucha arco iris/Trucha dorada mexicana	1 (14)	3 (43)	2 (29)	1 (14)	7 (11.5)	7 (6.7)
<i>Aeromonas eucrenophila</i>	Trucha arco iris					3 (4.9)	5 (4.8)

		1 (20)		2 (40)			
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	<i>Trucha arco iris</i>		1 (33)		1 (1.6)	2 (67)	3 (2.9)
<i>Aeromonas veronii</i>	<i>Trucha arco iris</i>		1 (33)		1 (1.6)	2 (67)	3 (2.9)
<i>Aeromonas encheleia</i>	<i>Trucha arco iris</i>	1 (33)	1 (33)	1 (33)			3 (2.9)
<i>Aeromonas popoffii</i>	<i>Trucha arco iris</i>	1 (33)		2 (67)	3 (4.9)		3 (2.9)
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>ranae</i>	<i>Trucha arco iris</i>		1 (50)		1 (1.6)	1 (50)	2 (1.9)
<i>Aeromonas media</i>	<i>Trucha arco iris</i>					1 (100)	1 (1)
<i>Aeromonas piscicola</i>	<i>Trucha arco iris</i>			1 (100)	1 (1.6)		1 (1)
<i>Aeromonas aquatica</i>	<i>Trucha arco iris</i>					1 (100)	1 (1)
<i>Aeromonas finlandiensis</i>	<i>Trucha arco iris</i>		1 (100)		1 (1.6)		1 (1)
<i>Aeromonas lacus</i>	<i>Trucha arco iris</i>					1 (100)	1 (1)
<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Trucha arco iris</i>					1(100)	1 (1)
Otras especies bacterianas	Hospedero	Hígado (n=1)	Bazo (n=1)	Riñón (n=1)	Total de aislamientos de peces (n= 3)	Sedimento (n= 3)	Total (n=6)
<i>Serratia fontícola</i>	<i>Trucha arco iris</i>	1 (25)		1 (25)	2 (66.7)	2 (50)	4 (66.7)
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Trucha arco iris</i>					1 (100)	1 (16.7)
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>Trucha dorada mexicana</i>		1(100)		1 (33.3)		1 (16.7)

Las regiones Oriente-Hidalgo y Zitácuaro presentaron el mayor número de *Aeromonas* spp. con 11 y ocho especies respectivamente. Para las regiones Centro-Pátzcuaro y Uruapan se identificaron cinco y cuatro especies respectivamente. Las dos regiones con el menor número de especies de *Aeromonas* fueron Centro Morelia y Huetamo. En cinco regiones las dos especies de *Aeromonas* presentes fueron *A. allosaccharophila* y *A. sobria*. Las especies de *A. lacus*, *A. media*, *A. veronii* y *A. aquatica* solamente se aislaron de granjas de la región Hidalgo. Las *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* y *A. piscícola* se aislaron exclusivamente de granjas de Zitácuaro y *A. finlandiensis* solo se aisló de la región Centro Pátzcuaro (**Tabla 3**).

Tabla 3. Prevalencia de *Aeromonas* spp. por regiones

Región	Región Hidalgo	Región Zitácuaro	Región Centro - Pátzcuaro	Región Uruapan	Región Centro-Morelia	Región Huetamo
Número de granjas analizadas por región	25	24	7	5	1	2
Especie	Número de especies (%)					
<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	6 (12.8)	2 (5.4)	4 (33.3)	1 (16.7)	0	1 (100)
<i>Aeromonas aquatica</i>	1 (2.1)	0	0	0	0	0

<i>Aeromonas bestiarum</i>	2 (4.3)	5 (13.5)	0	0	0	0
<i>Aeromonas encheleia</i>	0	3 (8.1)	0	0	0	0
<i>Aeromonas eucrenophila</i>	1 (2.1)	4 (10.8)	0	0	0	0
<i>Aeromonas hydrophila</i>	9 (19.1)	0	2 (16.7)	1 (16.7)	0	0
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	2 (4.3)	1 (2.7)	0	0	0	0
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>ranae</i>	2 (4.3)	0	0	0	0	0
<i>Aeromonas lacus</i>	1 (2.1)	0	0	0	0	0
<i>Aeromonas media</i>	1 (2.1)	0	0	0	0	0
<i>Aeromonas popoffii</i>	1 (2.1)	2 (5.4)	0	0	0	0
<i>Aeromonas rivipollensis</i>	2 (4.3)	8 (21.6)	2 (16.7)	3 (50)	0	0
<i>Aeromonas sobria</i>	16 (34)	11 (29.7)	2 (16.7)	1 (16.7)	1 (100)	0
<i>Aeromonas veronii</i>	3 (6.4)	0	0	0	0	0
<i>Aeromonas</i> sp.	0	0	1 (8.3)	0	0	0
<i>Aeromonas finlandensis</i>	0	0	1 (8.3)	0	0	0
<i>Aeromonas piscicola</i>	0	1 (2.7)	0	0	0	0
Totales de aislamientos	47	37	12	6	1	1
Número de especies	11	8	5	4	1	1

Se analizaron 387 peces de los cuales resultaron positivos para *Aeromonas* spp. el 13% (52/114) y negativos el 87% (335/387). Las especies de *Aeromonas* más frecuentemente que se aislaron en peces corresponden para *A. sobria* (38.5%), *A. allosaccharophila* (11.5%) y *A. hydrophila* (11.5%) (**Tabla 4**).

Tabla 4. Frecuencia de *Aeromonas* spp. por peces positivos

Especie de <i>Aeromonas</i>	Cantidad de peces positivos (Frecuencia % por pez)
<i>Aeromonas sobria</i>	20 (38.5)
<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	6 (11.5)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	6 (11.5)
<i>Aeromonas bestiarum</i>	5 (9.6)
<i>Aeromonas eucrenophila</i>	3 (5.8)

<i>Aeromonas popoffii</i>	3 (5.8)
<i>Aeromonas rivipollensis</i>	3 (5.8)
<i>Aeromonas encheleia</i>	1 (1.9)
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	1 (1.9)
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>ranae</i>	1 (1.9)
<i>Aeromonas veronii</i>	1 (1.9)
<i>Aeromonas finlandiensis</i>	1 (1.9)
<i>Aeromonas piscícola</i>	1 (1.9)
	Total de peces: 52

De los 387 peces analizados las bacterias con las prevalencias globales mayores fueron *Aeromonas sobria* con 5.2%, *A. allosaccharophila* con 1.6%, *A. hydrophila* 1.6% y *A. bestiaurm* con 1.3% (**Tabla 5**).

Tabla 5. Frecuencia de *Aeromonas* spp. por peces analizados

Catálogo de especies	Peces positivos	Prevalencia global (%) de <i>Aeromonas</i> spp. por peces analizados
<i>Aeromonas sobria</i>	20	5.2
<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	6	1.6
<i>Aeromonas hydrophila</i>	6	1.6
<i>Aeromonas bestiarum</i>	5	1.3
<i>Aeromonas eucrenophila</i>	3	0.8
<i>Aeromonas popoffii</i>	3	0.8
<i>Aeromonas rivipollensis</i>	3	0.8
<i>Aeromonas encheleia</i>	1	0.3

<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	1	0.3
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>ranae</i>	1	0.3
<i>Aeromonas veronii</i>	1	0.3
<i>Aeromonas finlandiensis</i>	1	0.3
<i>Aeromonas piscicola</i>	1	0.3
Total	52	13.9

La identificación molecular con el gen *rpoD* permitió identificar *Aeromonas* spp. patógenas de peces y otras especies no asociadas a peces de cultivo como *Aeromonas rivipollensis* y *Aeromonas finlandiensis*.

3.2 Análisis filogenético

Se obtuvo el árbol de similitud de las secuencias nucleotídicas de las *Aeromonas* spp. obtenidas de las truchas arco iris y dorada, asimismo se incluyeron 42 especies de referencia de la base de datos del NCBI para determinar la distancia genética dentro y entre las especies mediante el análisis del vecino más cercano (Fig.1). Cada aislado se agrupó con su respectiva especie de referencia, a excepción de 9 aislamientos.

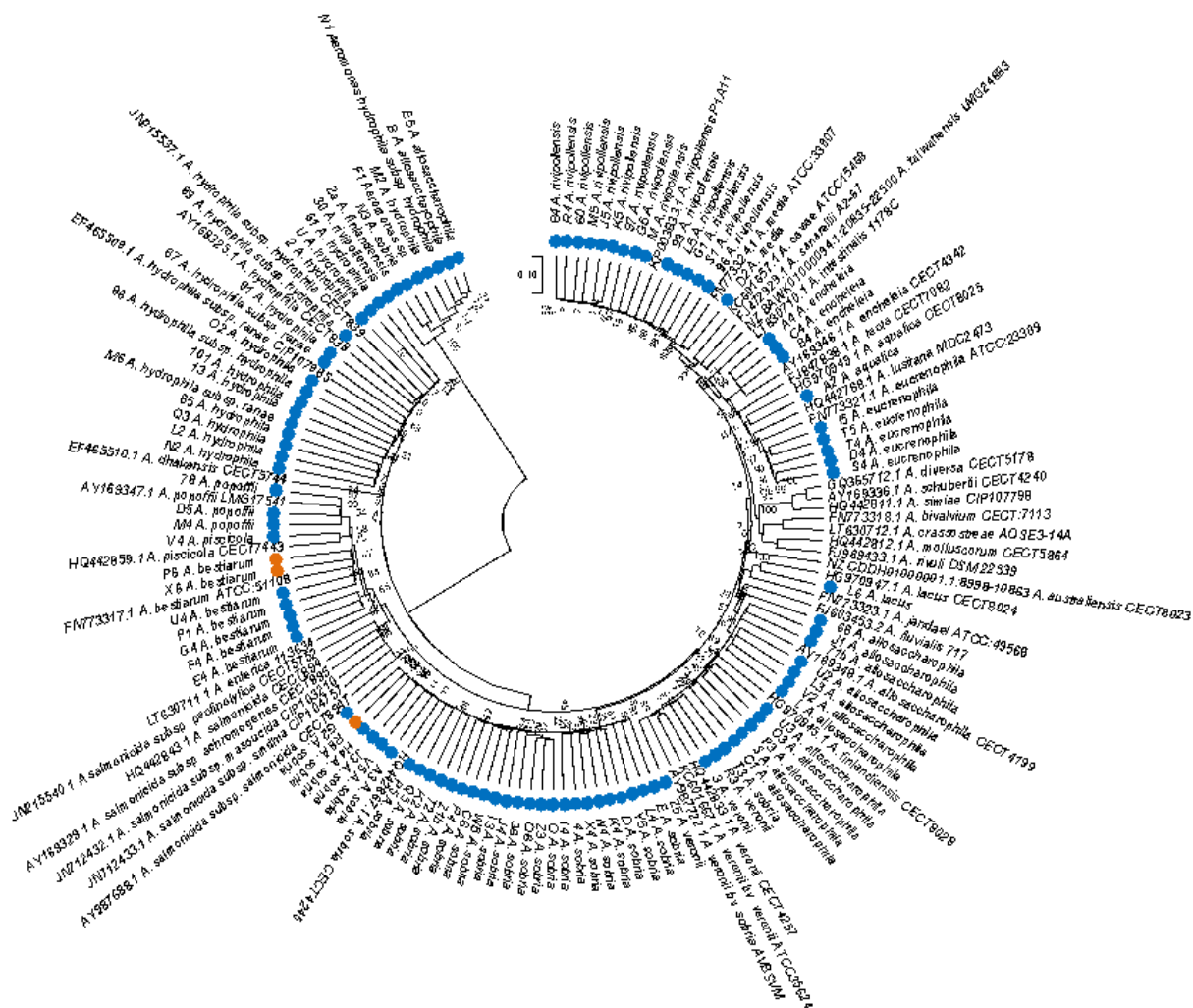


Fig 1. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen *rpoD* de las *Aeromonas* spp. de dos especies de truchas y *Aeromonas* spp. de referencia (sin viñeta). En viñeta azul se indican los aislamientos de la trucha arco iris y en viñeta naranja los aislamientos de la trucha dorada. Los números de cada nodo indican los valores de confianza. La barra de distancia es el número de sustituciones de nucleótidos por sitio.

3.3 Identificación de los factores asociados con *Aeromonas* spp.

En el estudio epidemiológico se identificó un factor de riesgo con asociación estadística para la presencia de *Aeromonas* spp. en las granjas trutícolas, corresponde al trabajador cuando tiene aves de corral en su casa. Además se identificaron dos factores de la granja asociados a protección, el abastecimiento de

agua a partir de manantial y la disposición de los desechos de los peces fuera de la instalación acuícola (**Tabla 6**). También se identificaron factores neutros para la granja 37 y para el trabajador 20 respectivamente. En dichos factores los intervalos de la razón de momios (RM) no fueron válidos, ya que incluyó al 1 y las pruebas estadísticas resultaron no significativas; por lo que estos 57 factores pueden ser considerados como de riesgo, pero también puede ser de protección (**ANEXO 2**). Entre los factores neutros asociados a la granja se encontraron los referentes a los procedimientos de bioseguridad, como son la ausencia de sistemas de desinfección en los accesos de la granja, frecuencia de limpieza de estanquería y el uso de cal. Asimismo, la presencia de animales silvestres (ajolotes, caracoles, mapaches, ranas, tejones y víboras) y animales domésticos (perros, gallinas, guajolotes y vacas). Respecto a los factores neutros asociados al trabajador se identificaron la presencia de animales domésticos en su hogar (cerdos, borregos, gatos, guajolotes y vacas), las referentes a su estado de salud e higiene personal como es el lavado de sus manos. Finalmente se analizó el grado de cumplimiento de las Buenas prácticas de producción acuícola (BPPA) de las 64 granjas muestreadas, una granja cumplió con las BPPA.

Tabla 6. Factores de riesgo y protección asociados a la presencia de *Aeromonas* spp. en las granjas trutícolas

Factor de riesgo asociados al trabajador				
Exposición	Riesgo relativo (IC 95%)	Razón de productos cruzados (IC 95%)	Chi cuadrada	Prueba bilateral Mantel Haenszel (<i>p</i>)
Animales domésticos				
Tiene gallinas	1.48	3.28	4.48	0.03

	(1.03-2.14)	(1.07-10)		
Factores de protección de la granja				
Exposición	Riesgo relativo (IC 95%)	Razón de productos cruzados (IC 95%)	Chi cuadrada	Prueba bilateral Mantel Haenszel (<i>p</i>)
Abastecimiento de agua				
La fuente de agua es manantial	0.64 (0.41-1.01)	0.31 (0.10-0.92)	4.52	0.03
Manejo de desechos				
Los desechos de los peces son enterrados fuera de la granja	0.65 (0.43-0.97)	0.30 (0.10-0.89)	4.77	0.02

IC=índice de confianza

3.4 Calidad de agua en las granjas trutícolas Michoacanas

Las unidades de producción acuícola presentaron sistemas semicerrados de cultivo, ya que existió un cierto control sobre el agua con un paso en el sistema de producción y posteriormente su efluente fue descartado (Wheaton, 1993; OIE, 2022). Cabe señalar que no fue posible contar con todas las mediciones de los parámetros de campo, por tal motivo para el análisis cualitativo de los datos se analizaron el resto de los 14 parámetros.

Con base en las especificaciones para el cultivo de la trucha arco iris, las mediciones se establecieron en tres categorías: baja, óptima y alta, según los intervalos de los parámetros analizados por cada granja. El valor representa el número de parámetros fisicoquímicos que se presentaron en cada granja dentro de los valores considerados como bajo, óptimo o alto (**Tabla 7**).

Tabla 7. Categorías de parámetros fisicoquímicos por granja

No. Granja	Baja	Óptima	Alta
1	5	8	1
2	3	10	1
3	4	9	1
4	3	9	2
5	3	9	2
6	1	11	2
7	4	10	0
8	4	8	2
9	4	8	2
10	4	9	1
11	5	8	1
12	5	8	1
13	4	8	2
14	4	8	2
15	3	10	1
16	3	9	2
17	4	9	1
18	5	8	1
19	4	8	2
20	3	9	2
21	3	11	0
22	1	11	2

23	2	10	2
24	3	9	2
25	4	9	1
26	4	8	2
27	2	10	2
28	3	10	1
29	4	8	2
30	2	11	1
31	3	9	2
32	3	9	2
33	4	9	1
34	3	10	1
35	2	9	3
36	2	8	4
37	4	9	1
38	2	11	1
39	2	11	1
40	3	10	1
41	5	6	3
42	2	10	2
43	2	10	2
44	2	10	2
45	2	10	2
46	4	8	2
47	5	7	2
48	4	8	2
49	2	10	2
50	2	10	2
51	3	9	2
52	4	9	1

53	3	9	2
54	3	9	2
55	3	11	0
56	3	10	1
57	3	10	1
58	4	9	1
59	3	10	1
60	3	9	2
61	5	8	1
62	4	9	1
63	5	7	2
64	5	9	0

De acuerdo a los intervalos de las especificaciones para la trucha arcoíris (*Onchorynchus mykiss*), de los 14 parámetros evaluados en el laboratorio para las 64 granjas, 212 mediciones fueron bajas, 585 están dentro de los óptimas y 99 tienen un valor alto.

Los nitratos, sulfatos, el hierro, amonio y los sólidos (totales y suspendidos) fueron los principales parámetros fisicoquímicos óptimos, mientras que el porcentaje de saturación del oxígeno disuelto se encontró bajo en el 14% de las granjas. El manganeso, cobre y zinc en el 100, 77 y 66 % de las granjas se encontraron altos. El valor representa el número de granjas de trucha arco iris por parámetro fisicoquímico establecidas dentro de los valores considerados como bajo, óptimo o alto, según las especificaciones de calidad de agua para el cultivo de la especie (**Tabla 8**).

Tabla 8. Calidad de agua por parámetro

Parámetro	Baja	Óptima	Alta
Nitratos	0	64	0
Sulfatos	0	64	0
Cobre	0	15	49

Hierro	0	64	0
Bario	0	28	36
Nitritos	0	62	2
Manganeso	0	0	64
Zinc	0	22	42
Dureza	4	60	0
Alcalinidad	2	62	0
*Oxígeno Disuelto	5	29	1
*pH	7	42	3
*Temperatura	7	47	0
Sólidos Totales	0	63	1
Sólidos Suspendidos	0	62	2
Sólidos Disueltos	9	53	2
*Conductividad	11	10	0
Amonio	0	64	0

*Determinaciones incompletas

3.5 Evaluación del grado de cumplimiento de Buenas prácticas de producción acuícola (BPPA)

La evaluación de las 33 preguntas acerca del grado de cumplimiento de las Buenas prácticas de producción acuícola en cada granja de trucha arco iris se adjuntan en el **ANEXO 3**. La encuesta consideró los principales aspectos sanitarios de las instalaciones acuícolas en caso de aplicarse se consideró positivo, considerándose 1 punto para cada pregunta, en caso contrario se otorgó 0. Derivado del total de las 33 preguntas se consideró como el 100%, de tal manera que cada granja obtuvo un total de aciertos que se utilizaron para el cálculo porcentual para cada una de ellas. Del análisis del grado de cumplimiento de BPPA en materia de aspectos sanitarios por granja se obtuvieron porcentajes <80% en 64 granjas de trucha arco iris por lo que no aprobaron; una granja aprobó ya que obtuvo >80% de cumplimiento de los aspectos sanitarios que se evaluaron (**Tabla 9**).

Tabla 9. Grado de cumplimiento por granja trutícola

TOTAL DE PREGUNTAS 33		
N° DE GRANJA	GRADO DE CUMPLIMIENTO (%)	APROBACIÓN
1	58	NO APROBADO
2	61	NO APROBADO
3	45	NO APROBADO
4	61	NO APROBADO
5	70	NO APROBADO
6	76	NO APROBADO
7	64	NO APROBADO
8	76	NO APROBADO
9	79	NO APROBADO
10	45	NO APROBADO
11	45	NO APROBADO
12	45	NO APROBADO
13	42	NO APROBADO
14	58	NO APROBADO
15	42	NO APROBADO
16	58	NO APROBADO
17	70	NO APROBADO
18	45	NO APROBADO
19	58	NO APROBADO
20	58	NO APROBADO
21	39	NO APROBADO
22	58	NO APROBADO
23	45	NO APROBADO
24	64	NO APROBADO
25	70	NO APROBADO
26	64	NO APROBADO

27	58	NO APROBADO
28	67	NO APROBADO
29	36	NO APROBADO
30	64	NO APROBADO
31	55	NO APROBADO
32	33	NO APROBADO
33	39	NO APROBADO
34	52	NO APROBADO
35	76	NO APROBADO
36	42	NO APROBADO
37	79	NO APROBADO
38	70	NO APROBADO
39	64	NO APROBADO
40	70	NO APROBADO
41	52	NO APROBADO
42	64	NO APROBADO
43	73	NO APROBADO
44	73	NO APROBADO
45	45	NO APROBADO
46	70	NO APROBADO
47	79	NO APROBADO
48	76	NO APROBADO
49	82	APROBADO
50	79	NO APROBADO
51	67	NO APROBADO
52	73	NO APROBADO
53	67	NO APROBADO
54	79	NO APROBADO
55	76	NO APROBADO
56	70	NO APROBADO

57	76	NO APROBADO
58	73	NO APROBADO
59	55	NO APROBADO
60	55	NO APROBADO
61	67	NO APROBADO
62	45	NO APROBADO
63	70	NO APROBADO
64	45	NO APROBADO

3.6 Perfiles de susceptibilidad antimicrobiana

Los aislamientos bacterianos se evaluaron contra 21 antibióticos se especifica la concentración y resultados para cada uno de ellos (Anexo 4). Actualmente se cuentan con los perfiles de resistencia del 34% (36/106) de los aislamientos bacterianos de la trucha arco iris; de estos el 50% presentaron sensibilidad al esquema de antibióticos aplicado, observándose resistencias para los antibióticos beta-lactámicos del tipo de penicilinas, como son la Ampicilina-sulbactam del 97%, Amoxicilina-ácido clavulánico del 72% y Piperacilina-tazobactam del 56% (**Tabla 10**). Asimismo el 78% de los aislamientos presentaron resistencia a una cefalosporina de primera generación la Cefazolina. También se observaron resistencias del 50-60% para tres antibióticos carbapenémicos como el Ertapenem, Imipenem y Meropenem.

Tabla 10. Perfil de resistencia antimicrobiana de las especies bacterianas de la trucha arco iris para distintas clases de antibióticos.

ANTIBIÓTICO	CONTENIDO DEL DISCO (µg)	AISLAMIENTOS RESISTENTES DE LA TRUCHA ARCO IRIS (%)
β-lactámicos-Penicilinas		
Amoxicilina-ácido clavulánico	20/10	72
Ampicilina-sulbactam	10/10	97
Piperacilina-Tazobactam	100/10	56

β-lactámicos- Cefalosporinas		
Cefazolina	30	78
Cefepima	30	19
Cefotaxima	30	25
Cefoxitina	30	25
Ceftazidima	30	25
Ceftriaxona	30	19
Cefuroxima sódica (parenteral)	30	25
β-lactámicos- Carbapenémicos		
Ertapanem	10	53
Imipenem	10	56
Meropenem	10	47
β-lactámicos- Monobactámicos		
Aztreonam	30	19
Aminoglucósidos		
Amikacina	30	44
Gentamicina	10	33
Tetraciclinas		
Tetraciclina	30	22
Quinolonas		
Ciprofloxacina	5	11
Levofloxacina	5	3
Inhibidores de folato		
Sulfametoxazol-trimetoprima	1.25/23.75	17
Anfenicoles		
Cloranfenicol	30	8

En relación con los valores de susceptibilidad antimicrobiana el 80-90% de las especies bacterianas mostraron sensibilidades para los antibióticos: Aztreonam, Ciprofloxacina, Levofloxacina, Sulfametoxazol-trimetoprima y el Cloranfenicol. Por

otra parte, se identificó que el 30% de los aislamientos bacterianos presentaron susceptibilidades intermedias para los antibióticos: Meropenem y Gentamicina (Fig.2).

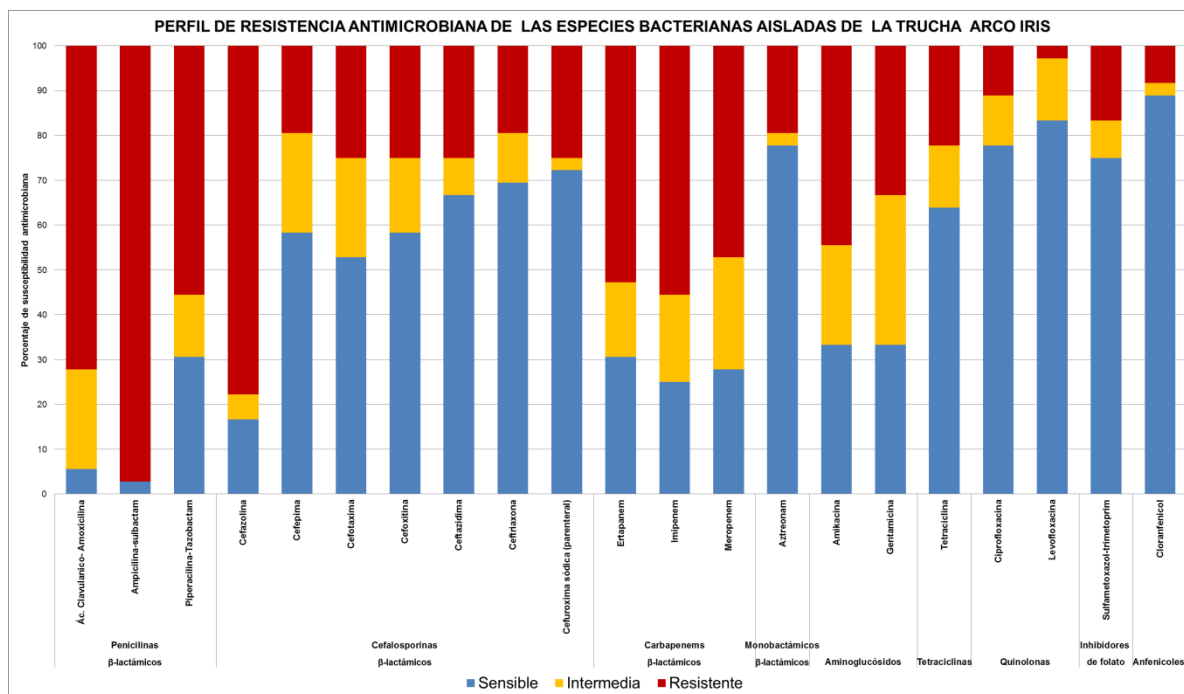


Fig.2 Perfil de resistencia antimicrobiana de las especies bacterianas aisladas de la trucha arco iris.

4. DISCUSIÓN

En el presente estudio se aislaron *Aeromonas* spp. de peces aparentemente sanos y enfermos, además de sedimentos, con una frecuencia de aislamiento del 36% y 47% respectivamente. Dichos valores son mayores a la frecuencias que se reportan para Michoacán por Salgado y colaboradores (2010), en donde se obtuvo una frecuencia del 20% con un análisis de peces aparentemente sanos procedentes de 21 granjas de trucha arco iris. Salgado y col. (2010) consideraron en el muestreo el 5% de las granjas de trucha arco iris de los principales estados productores en México, con el análisis final de 65 granjas.

El diseño experimental de la presente investigación se apega a un muestreo aleatorio de distribución proporcional, basado en las prevalencias previamente reportadas por Salgado y col. (2010). La diferencia en la frecuencia de aislamientos puede deberse a que el número de granjas seleccionadas en la presente investigación fue representativo, ya que se muestrearon aleatoriamente 57 instalaciones acuícolas ubicadas en zonas de microcuencas con más de tres instalaciones acuícolas. Adicionalmente, se realizó el muestreo dirigido en siete unidades de cuarentena productoras de crías dada la importancia desde el punto de vista sanitario, ya que de estos Centros de producción depende la calidad de crías distribuidas en Michoacán. Asimismo, hay diferencia en los órganos de los peces analizados, en la presente investigación para el aislamiento de *Aeromonas* spp. se analizaron el hígado, bazo y riñón, dichos órganos son los recomendados para el aislamiento de estas bacterias (Austin y Austin, 2012). Además de que el riñón y bazo son órganos que se consideran hematopoyéticos, por las funciones importantes en la implementación de respuestas inmunitarias necesarias para un estado homeostático (Liu *et al.*, 2019). Cabe señalar que también se tomaron muestras a partir de lesiones cutáneas de los peces en caso de presentarse. Además de revisar los órganos hematopoyéticos, Salgado y colaboradores, analizaron de cada pez, branquias e intestino. No obstante, reportaron resultados negativos para el aislamiento bacteriano a partir de riñón, órgano del cual nosotros obtuvimos 21 aislamientos de *Aeromonas*, dicho órgano se considera el principal órgano hematopoyético en la mayoría de peces teleósteos

(Kondera *et al.*, 2013; Harjula, *et al.*, 2020). Otra diferencia, es el número de *Aeromonas* spp., en la presente investigación a través de la identificación molecular se identificaron 14 especies y 2 subespecies de *Aeromonas*; Salgado y col. 2010 discriminaron a nivel de especie basándose en pruebas bioquímicas, por lo que reportaron sólo dos especies, *A. hydrophila* y *A. salmonicida*, a nivel nacional. Por lo anterior, sugerimos que el muestreo realizado en nuestro trabajo fue adecuado y representativo.

Las *Aeromonas* spp., comúnmente son causantes de infecciones en la piscicultura de agua dulce, sin embargo, son escasas las investigaciones de epidemiología molecular de este patógeno. Es necesario realizar investigaciones que permitan identificar variables de riesgo asociadas a la presencia de *Aeromonas* spp. y disminuir el impacto económico al sector productivo piscícola. Actualmente no existen reportes previos en México, sobre los factores de riesgo asociados con la presencia de *Aeromonas* spp. en las granjas trutícolas, por lo que este trabajo es el primer estudio epidemiológico formal que se realiza. En el presente estudio se identificó un factor de riesgo, la presencia de aves de corral en la granja. Estudios recientes en las granjas de tilapia demuestran una prevalencia alta de *Aeromonas* durante el verano, que se relaciona a una calidad del agua mala y el uso de estiércol de aves de corral lo que representa factores de estrés para los peces y los hace más susceptibles a las enfermedades (El-Gohary *et al.*, 2020; Salem *et al.*, 2020). Particularmente, el estiércol de pollos se incorpora como abono orgánico animal para la fertilización de la estanquería en las instalaciones piscícolas, ya que contiene una mezcla de materia orgánica y nutrientes minerales (FAO, 2006). Los fertilizantes orgánicos se consideran económicos y aumentan la producción de peces, en comparación a los fertilizantes inorgánicos (FAO, 2006; Boyd, 2018). Asimismo, el abono orgánico animal es útil como alimento directo y reemplaza parcialmente los alimentos complementarios; incrementa la productividad microbiana acuática, lo cual acelera la descomposición de la materia orgánica y sirve como alimento para el zooplancton, que a su vez resulta más abundante. Dentro de los abonos animales, el estiércol de pollo se considera el más rico en nutrientes, por la cantidad de nitrógeno, fósforo y potasio que aporta al agua (FAO, 2006). No obstante, aportes

excesivos de estiércol pueden causar agotamiento del oxígeno disuelto como resultado de la demanda de oxígeno para descomponerlo (Boyd, 2018). Por lo que es recomendable vigilar frecuentemente el estanque, durante la fertilización con los abonos animales, con la finalidad de evitar pérdidas de peces (FAO, 2006).

Las *Aeromonas* spp. son frecuentemente aisladas de vertebrados y otros hospederos que son los reservorios para la introducción e intercambio de *Aeromonas* spp. en el ambiente (Janda y Abbot, 2010). Por ejemplo, se reporta la prevalencia de cepas patógenas de *Aeromonas* en heces de pollos que podrían diseminarse a través de animales y del mismo personal (Igbinosa, 2014). Respecto a los factores de protección, se identificó el manantial como abastecimiento de agua, sin embargo existe evidencia que indica que el agua actúa como un vehículo para la diseminación de esta bacteria (Pablos *et al.*, 2011). En investigaciones previas se reporta el aislamiento frecuente de *Aeromonas* del ambiente acuático (Miyagi *et al.*, 2016; Fernández y Figueras, 2020;). Miyagi y colaboradores, (2016), realizaron aislamientos de *Aeromonas* de los manantiales, presas y pozos en Okinawa Japón, con lo que encontraron que el agua de manantial fue la segunda fuente de aislamiento de *Aeromonas* spp. En el 61% de las granjas de trucha arco iris que se muestrearon en la presente investigación la fuente de agua correspondió a un manantial. Otro factor de protección que se reporta por primera vez asociado con *Aeromonas* spp. son los desechos de los peces que son enterrados fuera de la granja, en fosas profundas, probablemente al estar lejos de los perros se impide que el material biológico se disperse a la instalación piscícola. Además de las implicaciones sanitarias de este material en descomposición dentro de la zona, también atrae plagas, moscas y otros animales domésticos (FAO, 1999). En cantidades bajas de residuos de peces, la FAO recomienda que se entierren bajo tierra en fosas de al menos dos metros de profundidad y cubrirse con un mínimo de 200 mm de tierra, para evitar la infestación de plagas y acelerar el proceso de putrefacción. Este método no es adecuado cuando las capas freáticas están cerca de la superficie. Además de que el compostaje de animales acuáticos no inactiva a todos los patógenos, por lo que en el Código Sanitario para los Animales Acuáticos de la Organización Mundial de Salud Animal (OMSA, 2022) se recomienda antes del

proceso de compostaje, en residuos de consideración de riesgo alto como son aquellos que constituyan, un riesgo grave para la salud de los animales acuáticos o de las personas, que los residuos deben calentarse (85°C durante 25 minutos o una combinación equivalente de temperatura y tiempo). Otros procesos que recomienda para la eliminación de los residuos de animales acuáticos de riesgo alto y bajo, son la incineración así como la esterilización. En el caso de residuos de animales acuáticos de bajo riesgo, se puede llevar a cabo también el compostaje sin tratar térmicamente los residuos antes de su eliminación (OMSA, 2022). Particularmente, las BPPA de trucha en México, indican que los peces muertos y vísceras pueden ser incinerados en la granja, en un lugar adecuado para este propósito o implementar el enterramiento de los desechos en áreas adecuadas (SENASICA-CIAD, 2003).

Además, se contrastaron los parámetros de calidad de agua con mediciones completas, así como el aspecto de cumplimiento de BPPA (aprobadas y no aprobadas) en el programa Epi-InfoTM, no obstante, no se observaron resultados respecto al análisis de factores (riesgo y/o protección) asociados con *Aeromonas* para estas variables. Del análisis de la encuesta para la granja trutícola y el trabajador respectivamente, se identificaron un total de 57 factores neutros, para los cuales los intervalos no fueron válidos ya que incluyó al 1 y las pruebas estadísticas resultaron no significativas, dichos factores pueden ser considerados como de riesgo, pero también pueden ser de protección.

En el presente estudio se identificaron 14 especies de *Aeromonas* (*A. allosaccharophila*, *A. aquatica*, *A. bestiarum*, *A. encheleia*, *A. eucrenophila*, *A. hydrophila*, *A. lacus*, *A. media*, *A. popoffii*, *A. rivipollensis*, *A. sobria*, *A. veronii*, *A. finlandiensis*, *A. piscícola*) y dos subespecies en las granjas de trucha arco iris (*A. hydrophila* subsp. *hydrophila* y *A. hydrophila* subsp. *ranae*). Dicha diversidad de *Aeromonas* spp. es mayor a la que se reporta previamente en México, ya que se identificaron dos especies *A. hydrophila* y *A. salmonicida* para México con 23% y 2% de frecuencia respectivamente (Salgado *et al.*, 2010). Para Michoacán Salgado y colaboradores, reportaron *Aeromonas* spp. y *A. hydrophila* con 4% y 1% de frecuencia correspondientemente. También la diversidad de especies de *Aeromonas*

es mayor a la que reportaron Duman y colaboradores, (2018) para granjas de trucha arco iris en Turquía ya que mencionan 11 especies.

La especie más prevalente en las muestras de peces correspondió para *Aeromonas sobria* con el 38% de los aislamientos, resultados similares se reportan en un estudio realizado por Duman *et al.*, (2018), quienes indican un 39% de aislamientos para *A. sobria*. La segunda especie prevalente en peces fue *A. hydrophila*, mientras que Duman *et al.*, (2018), reportan *A. salmonicida*, dicha bacteria no se aisló en el presente estudio. Este es el primer reporte mundial de *Aeromonas finlandiensis* en muestras de peces, en investigaciones previas se aislaron de lagos y ríos de Finlandia (Beaz *et al.*, 2015), en el presente estudio solo se obtuvo un aislamiento del bazo de una trucha procedente de la región de Centro Pátzcuaro. Los principales órganos de aislamiento de las *Aeromonas* spp., fueron el riñón y el hígado, Duman *et al.*, (2018), identificaron también el hígado como el principal órgano de aislamiento.

En las muestras de sedimento la especie más prevalente fue *A. rivipollensis* con el 28%, este es el primer reporte de dicha bacteria en sedimentos. Se aisló además en hígado y riñón de la trucha arco iris y, además, recientemente Reyes y colaboradores (2019), la aislaron en muestras de bazo e intestino de trucha arco iris silvestre en México.

En cinco de las regiones trutícolas, las dos especies de *Aeromonas* presentes fueron *A. allosaccharophila* y *A. sobria*, lo cual sugiere que ambas especies están ampliamente distribuidas en granjas trutícolas de Michoacán, ambas especies están asociadas con infecciones en humanos (Figueras y Beaz, 2014) y peces (Austin y Austin, 2012).

Algunas especies de *Aeromonas* se identificaron exclusivamente en ciertas regiones trutícolas, tal es el caso de *A. lacus*, *A. media*, *A. veronii* y *A. aquatica* las cuales se aislaron de granjas de la región Hidalgo. Existen reportes previos de *A. lacus* y *A. aquatica* de aislamientos ambientales (Beaz *et al.*, 2015), por lo que este es el primer reporte de dichas especies en muestras de peces. Las *A. media* y *A. veronii* están asociadas con infecciones en humanos (Figueras y Fernández, 2020) y trucha arco iris (Rehulka, 2002; Reyes *et al.*, 2019). Las *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* y *A. piscícola* se aislaron exclusivamente de granjas de Zitácuaro. Recientemente *A.*

piscícola se aisló de trucha arco iris silvestre en el parque corral de Piedra en México (Reyes *et al.*, 2019). Existen reportes de *A. hydrophila* en el cultivo de la trucha arco iris causante de la septicemia motil por *Aeromonas* y tasas altas de mortalidad (Zhan *et al.*, 2015). Algunas cepas de *A. hydrophila* también se reportan patógenas para otros animales como los anfibios y reptiles (Huys *et al.*, 2003; Janda y Abbot, 2010). En la encuesta realizada a las granjas de trucha arco iris, se reportó la presencia de anfibios (ranas y ajolotes), así como de reptiles (tortugas) en los estanques en el 44% de las instalaciones (28/64), los cuales podrían ser reservorios de *Aeromonas*. No obstante, durante el muestreo no se observaron estos animales silvestres en los estanques. En el presente estudio se reporta por primera vez *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* en el cultivo de la trucha arco iris.

Se identificaron otros dos géneros bacterianos en el cultivo de las truchas arcoiris correspondientes a *Serratia fonticola* y *Pseudomonas* spp. con cuatro y un aislamientos respectivamente, aunque su frecuencia fue baja tienen potencial patógeno tanto para peces como para los mismos seres humanos. Diversas *Pseudomonas* spp. causan severas pérdidas en la acuicultura, en particular *P. fluorescens*, *P. putida* y *P. tructae*, se encuentran como patógenos de la trucha arco iris. *P. tructae* en un brote infeccioso en trucha arco iris de granja en Corea ocasionó el 15% de mortalidad (Oh *et al.*, 2019). De acuerdo al gen *rpoD* que se amplificó para la identificación de las *Aeromonas* spp., no fue posible identificar a nivel de especie la *Pseudomonas*, por lo que se requiere de estudios moleculares adicionales. Salgado y colaboradores (2010), aislaron también *Pseudomonas* en granjas trutícolas de Michoacán. En estudios previos *Serratia fonticola* se aisló del intestino de la carpa (*Carassius carassius*) (Kačániová *et al.*, 2019) y riñón de paiche en acuario (*Arapaima gigas*) (Choresca *et al.*, 2008), en el presente estudio *S. fonticola* se aisló de hígado y riñón de trucha arco iris, este es el primer reporte mundial de dicha bacteria para la trucha arco iris. En la trucha dorada mexicana se identificaron tres especies: *A. sobria* (1), *A. bestiarum* (1) y *Plesiomonas shigelloides* (1) este es el primer reporte bacteriológico para esta trucha nativa que se considera amenazada (Ruiz *et al.*, 2017), por lo que las enfermedades representan un riesgo alto dado su estado de conservación. Aislamientos de *P. shigelloides* se reportan

para la trucha arco iris en Michoacán (Salgado *et al.*, 2010). Es importante mencionar que los individuos de trucha arco iris de las cuales se aislaron los diferentes géneros bacterianos, no presentaron patologías macroscópicas y posterior a los muestreos, no se reportaron brotes infecciosos en las granjas que se analizaron. Resultados similares se reportan en las granjas de carpa y bagre donde no se observó una correlación positiva entre el aislamiento bacteriano y patologías en los peces (Syrova *et al.*, 2018; Adah *et al.*, 2021). Para el desarrollo de la enfermedad en los peces están involucrados distintos factores como que el agente infeccioso sea capaz de ocasionar desórdenes, el sistema inmune del hospedero, las condiciones ambientales, la virulencia del agente bacteriano y las prácticas de manejo (Johnson y Paull, 2011; Pekala, 2018; Adah *et al.*, 2021).

La vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos (AMR) es de suma importancia en los entornos acuáticos y en particular su aparición en los peces de cultivo es uno de los principales retos a los que se enfrenta la acuicultura moderna (Grilo *et al.*, 2020; Preena *et al.*, 2020). Algunos ejemplos se reportan en diversas investigaciones sobre los perfiles de resistencia antimicrobiana de *Aeromonas* spp. aisladas de granjas piscícolas para el consumo humano y en peces ornamentales con resistencias de 80-100% de los aislamientos a distintas familias de antibióticos entre ellos los Betaláctamicos del tipo penicilina (Jacobs y Chenia, 2007; Borella *et al.*, 2020, , Saengsitthisak *et al.*, 2020). Asimismo en el presente estudio se identificaron aislamientos de *Aeromonas* resistentes para los betalactámicos del tipo penicilina, tal como la Ampicilina-sulbactam, Amoxicilina-ácido Clavulánico y la Piperacilina-Tazobactam del 97%, 72% y 56% respectivamente. Además para la Cefazolina, el 78% de los aislamientos presentaron resistencia. La resistencia intrínseca a los antibióticos β -lactámicos se debe principalmente a la producción de múltiples e inducibles betalactamasas (CLSI, 2016). Recientemente se reporta un incremento de este tipo de resistencia en *Aeromonas* de origen clínico y ambiental (Piotrowska *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2019;). Incluso las *Aeromonas* se consideran como agentes para la diseminación de la resistencia antimicrobiana en los ambientes acuáticos en particular en fuentes de agua residual al entorno natural (Baron *et al.*, 2017;

Piotrowska *et al.*, 2017; Grilo *et al.*, 2020) debido a la capacidad de adquirir mecanismos de resistencia antimicrobiana.

Nuestros resultados muestran que el 80-90% de los aislamientos de *Aeromonas* de la trucha arco iris presentaron sensibilidades para dos Quinolonas (Ciprofloxacina y Levofloxacina), el Aztreonam, Sulfametoxazol-trimetoprima y el Cloranfenicol. Hallazgos similares se reportan en granjas de tilapia (*Oreochromis niloticus*) en la India donde encontraron una sensibilidad del 86-100% de los aislamientos de *Aeromonas* para las Quinolonas, Aztreonam y el Cloranfenicol (Preena *et al.*, 2021). Asimismo, en peces silvestres, de cultivo en Italia y de ornato en Tailandia, se observaron sensibilidades a las *Aeromonas* spp. para el Cloranfenicol (Borella *et al.*, 2020; Saengsitthisak *et al.*, 2020). Aunque el Cloranfenicol está prohibido en acuicultura, el único derivado de los fenicoles con autorización es el Florfenicol. Entre otros antibióticos que se permiten en acuicultura se encuentran la Oxitetraciclina, la Sulfamerazina y Sulfadimetoxina-ormetoprim (FDA, 2020). En el presente estudio se observaron que el 50-60% de los aislamientos bacterianos fueron resistentes para los antibióticos carbapenémicos (Ertapenem, Imipenem y Meropenem), lo que coincide con Preena *et al.*, (2021), quienes reportan que el 71% de los aislamientos de *Aeromonas* de Tilapia (*Oreochromis* sp.) presentan resistencia al Imipenem. Previos estudios reportan que la resistencia de las *Aeromonas* spp. a los carbapenémicos se debe principalmente a la expresión de las carbapenemasas, enzimas que hidrolizan a este tipo de antibióticos (Sinclair *et al.*, 2016; Wang *et al.* 2021; Conte *et al.*, 2020;).

Actualmente solo existe un estudio previo por Capkin *et al.*,(2015), sobre los perfiles de resistencia de *Serratia fonticola* aisladas de muestras de agua y sedimento en granjas trutícolas de Turquía. En dicho estudio se reportan aislamientos resistentes para los betalactámicos del tipo penicilina (Ampicilina), Carbapenémicos (Imipenem) y para el Monobactámico Aztreonam. No obstante, en el presente estudio se reportan aislamientos de la trucha arco iris, con una resistencia más amplia para otras clases de antibióticos, entre los cuales están la Tetraciclina y los Aminoglucósidos, además de la resistencia a los betaláctamicos del tipo penicilina/ Carbapenémicos. Hallazgos similares se reportan para miembros del género *Serratia* ya que poseen resistencias

intrínseca y adquirida para una variedad de familias de antibióticos que incluyen a los betaláctamicos, aminoglucósidos, quinolonas y polipéptidos. Por lo que las infecciones por *Serratia* spp. se consideran un importante problema sanitario debido a su multirresistencia elevada (Sandner *et al.*, 2018). Nuestros resultados muestran que el aislamiento de *Serratia fonticola* de la trucha arco iris presentó sensibilidad para diferentes cefalosporinas aplicadas como la Cefepima, Cefotaxima, Ceftazidima, Cefuroxima y a una Quilonona la Levofloxacin. A diferencia del estudio por Capkin *et al.*, (2015), en el presente trabajo el aislamiento fue sensible para el Aztreonam.

Los resultados de la resistencias antimicrobianas en las bacterias aisladas de la trucha arco iris se reportan también ampliamente en otros peces de cultivo, dichas resistencias representan una problemática para la salud de éstos (Zdanowicz *et al.*, 2020) y uno de los mayores retos para la acuicultura (Preena *et al.*, 2020), por lo que urgen estrategias para el biocontrol de las bacterias multirresistentes como es el posible uso de los bacteriófagos.

Otro factor de vigilancia en la piscicultura es la calidad del agua ya que algunos parámetros fisicoquímicos pueden comprometer la producción de una granja acuícola. Existe un intervalo adecuado de factores fisicoquímicos y biológicos que son necesarios para garantizar el éxito en el cultivo de los organismos (Arredondo y Ponce, 1998). Es importante mencionar que las unidades de producción acuícola presentaron sistemas de producción semicerrados, asimismo la mayoría de los parámetros fisicoquímicos de las granjas se encontraron dentro de la categoría óptima. Welker *et al.*, 2019 menciona que el oxígeno disuelto parece ser el principal parámetro limitante para el cultivo de la trucha arco iris. En la presente investigación el porcentaje de saturación de oxígeno disuelto en el agua se encontró bajo (<60%) en 5 de las granjas para los que se determinó, cabe señalar que en dos de ellas se aislaron *Aeromonas* spp. a partir del análisis microbiológico de los peces, no obstante no se presentaron brotes infecciosos en las granjas trutícolas. Los productores de las cinco granjas indicaron que realizaban la limpieza de la estanquería semanal (2/5), quincenal (1/5), diaria (1/5) o mensual (1/5). Sin embargo, las concentraciones de oxígeno bajas se pueden asociar a la presencia de materia orgánica en los estanques, por lo que es necesario implementar una limpieza

correcta y periódica de la estanquería. Además con el incremento de densidad de organismos (número de peces por m²), las concentraciones de oxígeno disminuyen (Segner et al., 2012).

La eutroficación de los cuerpos de agua también acarrea un incremento explosivo en algunas poblaciones microbianas entre las que se pueden seleccionar alguna de las especies descritas. En una granja con el 49% de saturación de Oxígeno disuelto en el agua se observaron macroscópicamente los peces con las branquias inflamadas, no obstante no se aislaron *Aeromonas* spp. En peces de la familia Mormyridae se reporta que una superficie branquial mayor podría representar una técnica compensatoria para las limitaciones fisiológicas de la hipoxia (Chapman y Hulen 2006). En un estudio previo en el cultivo de la trucha arco iris se reporta que una exposición prolongada a condiciones de baja saturación de oxígeno (52%) resulta en el incremento de estrés, reducción del crecimiento y la sobrevivencia en los organismos (Welker et al., 2019). Por lo que es necesario el monitoreo frecuente del oxígeno disuelto en las granjas trutícolas al ser un parámetro limitante para la producción. Por otro lado en una granja trutícola se detectó moderada sobresaturación de oxígeno disuelto, ya que presentó 102% lo que indica una presencia superior de productores primarios (algas y fitoplancton), desarrollados gracias a un exceso de nutrientes y a la disponibilidad de la luz, no obstante puede ocurrir agotamiento parcial del oxígeno disuelto por la noche cuando el fitoplancton reduce a cero la fotosíntesis (Taylor y Miller 2001). A pesar de la sobresaturación de oxígeno en el cultivo de la trucha arco iris no se presentaron efectos negativos, hallazgos similares se reportan por Ritola et al., (1999) en cultivos de trucha arco iris con moderada sobresaturación de oxígeno en el agua <140%.

En el estudio de calidad de agua en las granjas también se detectaron metales como el Manganeseo, Cobre y Zinc por arriba de las especificaciones para el cultivo de la trucha arco iris en el 100, 77 y 66% de las granjas respectivamente. Actualmente se considera que la presencia de metales en el ambiente acuático como los ríos es una forma de contaminación, en particular los ambientes dulceacuícolas se contaminan rápidamente debido a la actividad antropogénica (Ehiemere et al., 2022). No

obstante, se requieren estudios en los sedimentos y peces de las granjas para determinar el impacto de la contaminación por los metales mencionados con anterioridad, ya que el sedimento se reporta como la ruta principal de ingreso y reservorio de este tipo de contaminación en el ambiente acuático y en los peces de cultivo (Bai *et al.*, 2018; Ehiemere *et al.*, 2022).

5. CONCLUSIONES

- Debido a que se identificaron *Aeromonas* spp., *Serratia fonticola*, *Pseudomonas* spp. y *Plesiomonas shigelloides*, las cuales están implicadas en infecciones en humanos, se debe mantener un monitoreo constante en el sistema de granjas de producción por el potencial de afectar la salud pública. Es de especial interés la prevalencia alta de las *Aeromonas* spp. ya que algunas especies se reportan como patógenos primarios de peces y mamíferos.
- Se requiere la mejora de las medidas de bioseguridad para proteger a la trucha arcoíris de infecciones por *Aeromonas* spp., ya que se identificaron algunos factores de riesgo. Se identificaron también factores neutros que pueden ser considerados como de riesgo, pero también pueden ser de protección, por lo que se requiere de estudios epidemiológicos adicionales para identificar su participación.
- La identificación de bacterias resistentes a una amplia variedad de antibióticos en los sistemas de producción piscícola, sugieren que la adquisición de determinantes de resistencia a antibióticos puede provenir de otras bacterias del entorno e indica la necesidad inmediata de estrategias nuevas para el control de las infecciones bacterianas.

6. LITERATURA CITADA

Adah, D. A., Saidu, L., Oniye, S. J., Kazeem, H. M., Adah, S. A. 2021. **Prevalence and Risk Factors Associated with *Aeromonas hydrophila* infection in *Clarias gariepinus* and Pond Water from Fish Farms in Kaduna State, Nigeria.** *Jordan Journal of Biological Sciences*, 14(3).

Arredondo, F.J.L., Ponce P.J.T. 1998. **Calidad del Agua en Acuicultura.** Conceptos y aplicaciones. México: AGT editor S.A.

Assane, I. M., de Sousa, E. L., Valladão, G. M. R., Tamashiro, G. D., Criscoulo-Urbinati, E., Hashimoto, D. T., Pilarski, F. 2021. **Phenotypic and genotypic characterization of *Aeromonas jandaei* involved in mass mortalities of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) in Brazil.** *Aquaculture*, 541, 736848. .

Assefa, A., Abunna, F. 2018. **Maintenance of fish health in aquaculture: Review of epidemiological approaches for prevention and control of infectious disease of fish.** *Veterinary Medicine International* 2018, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2018/5432497>.

Austin B., Austin D.A. 2012. **Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish**, 6th ed. Heidelberg, Germany: Springer. ISBN 978-3-319-32673-3. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-32674-0>.

Austin, B. 2019. **Methods for the diagnosis of bacterial fish diseases.** *Marine Life Science & Technology*, 1(1), 41-49. <https://doi.org/10.1007/s42995-019-00002-5> .

Azzam-Sayuti, M., Ina-Salwany, M. Y., Zamri-Saad, M., Yusof, M. T., Annas, S., Najihah, M. Y., Amal, M. N. A. 2021. **The prevalence, putative virulence genes and antibiotic resistance profiles of *Aeromonas* spp. isolated from cultured freshwater fishes in peninsular Malaysia.** *Aquaculture*, 540, 736719. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736719>

Bai, L., Liu, X. L., Hu, J., Wang, Z., Ha, G., Li, S. L. Liu, C. Q. 2018. **Heavy metal accumulation in common aquatic plants in rivers and lakes in the Taihu Basin.** *International Journal of Environmental Research and Public Health* 15, 2857. <https://doi.org/10.3390/ijerph15122857>.

Baron, S., Granier, S.A., Larvor, E., Jouy, E., Cineux, M., Wilhelm, A., Gassilloud, B., Le Bouquin, S., Kempf, I., Chauvin, C., 2017. **Aeromonas diversity and antimicrobial susceptibility in freshwater – an attempt to set generic epidemiological cut-off values.** *Frontiers in microbiology*. 8, 503. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00503>.

Beaz H.R., Latif E. F., Hossain, M. J., Berg, K., Niemi, R. M., Rapala, J. 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(3), 161-168. <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2015.02.005>.

Beaz H. R., Figueras, M. J. 2013. **Aeromonas spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease.** *Journal of fish diseases*, 36(4), 371–388. <https://doi.org/10.1111/jfd.12025>.

Bebak, J., Wagner, B., Burnes, B., Hanson, T. 2015. **Farm size, seining practices, and salt use: risk factors for Aeromonas hydrophila outbreaks in farm-raised catfish, Alabama, USA.** *Preventive veterinary medicine*, 118(1), 161-168. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.11.001>.

Borella, L., Salogni, C., Vitale, N., Scali, F., Moretti, V. M., Pasquali, P., Alborali, G. L. 2020. **Motile aeromonads from farmed and wild freshwater fish in northern Italy: an evaluation of antimicrobial activity and multidrug resistance during 2013 and 2016.** *Acta Veterinaria Scandinavica*, 62(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s13028-020-0504-y>.

Boyd, C. E. 2019. **Water quality: an introduction**. Springer Nature. USA.
<https://doi.org/10.1007/978-3-030-23335-8>

Boyd, C. E. 2018. **Aquaculture pond fertilization**. *CABI Reviews*, (2018), 1-12.
<https://doi.org/10.1079/PAVSNNR201813002>.

Canals, R., Altarriba, M., Vilches, S., Horsburgh, G., Shaw, J. G., Tomás, J. M., & Merino, S. 2006. **Analysis of the lateral flagellar gene system of *Aeromonas hydrophila* AH-3**. *Journal of bacteriology*, 188(3), 852–862.
<https://doi.org/10.1128/JB.188.3.852-862.2006>.

Capkin, E., Terzi, E., Altinok, I. 2015. **Occurrence of antibiotic resistance genes in culturable bacteria isolated from Turkish trout farms and their local aquatic environment**. *Diseases of Aquatic organisms*, 114(2), 127-137.
<https://doi.org/10.3354/dao02852>.

Centros para el control y la prevención de enfermedades. (CDC). 2018. **Epi info™. Versión 7.2.2.6**. Disponible en: <https://www.cdc.gov/epiinfo/support/downloads.html> .
(Accesada en Julio del 2018).

Chang, Y. T., Hu, S. Y., Tsai, C. A. 2019. **Hemorrhagic blisters in fulminant *Aeromonas hydrophila* bacteremia: Case report and literature review**. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 12(2), 91. <https://doi.org/10.4103/1995-7645.250843>

Chapman, L. J., Hulen, K. G. 2001. **Implications of hypoxia for the brain size and gill morphometry of mormyrid fishes**. *Journal of Zoology*, 254(4), 461-472.
<https://doi.org/10.1017/S0952836901000966> .

Choresca C. H., Kim, J. H., Gomez, D. K., Jang, H., Joh, S. J., Park, S. C. 2008. **Isolation of *Serratia fonticola* from pirarucu *Arapaima gigas***. *Korean Journal of Veterinary Research*, 48(1), 89-92.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2021. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. 31st edition. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2016. **Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious Bacteria; approved guideline**-third edition CLSI document M45. Wayne, P.A.: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. 2021. **Anuario estadístico**. Disponible en: <https://www.gob.mx/conapesca/documentos/anuario-estadistico-de-acuacultura-y-pesca> (Accesada en Abril del 2023).

Conte, D., Palmeiro, J. K., Bavaroski, A. A., Rodrigues, L. S., Cardozo, D., Tomaz, A. P., Dalla, C.L. M. 2021. **Antimicrobial resistance in *Aeromonas* species isolated from aquatic environments in Brazil**. *Journal of Applied Microbiology*, 131(1), 169-181. <https://doi.org/10.1111/jam.14965>.

Department of conservation New Zealand Government. 2021. Lake Otamangakau: **Stressful conditions for trout**. Disponible en: <https://www.doc.govt.nz/parks-and-recreation/places-to-go/central-north-island/places/taupo-trout-fishery/fishery-science/stressful-conditions-for-trout-conditions-at-lake-otamangakau/#:~:text=Optimal%20dissolved%20oxygen%20concentrations%20for,%C2%B0%20C%20for%20rainbow%20trout>. (Accesada en Julio del 2022).

Dong, H. T., Techatanakitarnan, C., Jindakittikul, P., Thaiprayoon, A., Taengphu, S., Charoensapsri, W., Senapin, S. 2017. ***Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* caused disease and mortality in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.)**. *Journal of Fish Diseases*, 40(10), 1395-1403. <https://doi.org/10.1111/jfd.12617>

Duman, M., Satıcıoglu, I. B., Janda, J. M., Altun, S. 2018. **The determination of the infectious status and prevalence of motile *Aeromonas* species isolated from disease cases in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and aquarium fish**. *Journal of fish diseases*, 41(12), 1843–1857. <https://doi.org/10.1111/jfd.12896> .

Ehiemere, V. C., Ihedioha, J. N., Ekere, N. R., Ibeto, C. N., Abugu, H. O. 2022. **Pollution and risk assessment of heavy metals in water, sediment and fish (*Clarias gariepinus*) in a fish farm cluster in Niger Delta region, Nigeria.** *Journal of Water and Health*. <https://doi.org/10.2166/wh.2022.003>.

El-Gohary, F. A., Zahran, E., El-Gawad, A., Eman, A., El-Gohary, A. H., M Abdelhamid, F., Elsayed, M. M. 2020. **Investigation of the prevalence, virulence genes, and antibiogram of motile *Aeromonads* isolated from Nile tilapia fish farms in Egypt and assessment of their water quality.** *Animals*, 10(8), 1432. <https://doi:10.3390/ani10081432> .

Fečkaninová, A., Koščová, J., Mudroňová, D., Popelka, P., Toropilova, J. 2017. **The use of probiotic bacteria against *Aeromonas* infections in salmonid aquaculture.** *Aquaculture*, 469, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.11.042>

Felsenstein J. 1985. **Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap.** *Evolution* 39(4):783-791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x> .

Fernández B.A., Figueras, M. J. 2020. **An update on the genus *Aeromonas*: taxonomy, epidemiology, and pathogenicity.** *Microorganisms*, 8(1), 129. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010129>

Figueras J.M, Beaz H.R. 2014. ***Aeromonas***. En Batt, C.A., Lou T.M. (Eds). ***Encyclopedia of Food Microbiology*** (Second Edition). USA: Academic Press. pp.24-30.

Food and Agriculture Organization (FAO). 2022. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. Hacia la transformación azul.** Roma, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461es>.

Food and Agriculture Organization (FAO). 1999. **Fishery Harbour Manual on the Prevention of Pollution - Bay of Bengal Programme.** Disponible en:

<https://www.fao.org/3/x5624E/x5624e00.htm#Contents>. (Accesada en Mayo del 2023).

Food and Agriculture Organization (FAO). 2010. **Manual básico de piscicultura en estanques / Uruguay**. Dirección Nacional de Recursos Acuáticos. Departamento de Acuicultura. Montevideo: MGAP-DINARA-FAO, 2010. 50 pp.

Food and Agriculture Organization (FAO). 2022. ***Oncorhynchus mykiss*. Cultured Aquatic Species Information Programme**. Text by Cowx, I. G.. Fisheries and Aquaculture Division. Disponible en: https://www.fao.org/fishery/en/culturedspecies/Oncorhynchus_mykiss/en. (Accesada en Julio de 2022).

Food and Drug Administration (FDA) *Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos*. **Approved Aquaculture Drugs**. Disponible en: www.fda.gov/animal-veterinary/aquaculture/approved-aquaculture-drugs. (Accesada en Enero de 2020).

Fuentes V.M. A., Osornio E. J. L., Martínez P. C. A., Contreras Á. J. L., Barriga T. E., Ingle D.M. G. Valdez-Alarcón, J. J. 2022. **Bacterial and parasite co-infection in Mexican golden trout (*Oncorhynchus chrysogaster*) by *Aeromonas bestiarum*, *Aeromonas sobria*, *Plesiomonas shigelloides* and *Ichthyobodo necator***. *BMC Veterinary Research*, 18:137. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03208-5>.

Goharrizi, L. Y., Zorriehzahra, M. E. J., Adel, M. 2015. **The study on effect of temperature stress on occurrence of clinical signs caused by *Aeromonas hydrophila* in *Capoeta damascina* in vitro condition**. *Adv. Anim. Vet. Sci*, 3(7), 406-412.

Grilo, M. L., Sousa, S. C., Robalo, J., Oliveira, M. 2020. **The potential of *Aeromonas* spp. from wildlife as antimicrobial resistance indicators in aquatic**

environments. *Ecological Indicators*, 115, 106396.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106396> .

Harjula, S. K. E., Saralahti, A. K., Ojanen, M. J., Rantapero, T., Uusi-Mäkelä, M. I., Nykter, M., Rämet, M. 2020. **Characterization of immune response against *Mycobacterium marinum* infection in the main hematopoietic organ of adult zebrafish (*Danio rerio*)**. *Developmental & Comparative Immunology*, 103, 103523.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103523>

Horneman A., Ali A. 2011. ***Aeromonas***. En: Versalovic J., Carroll K, Funke G, Jorgensen J, Landry M, Warnock D. (Ed.), Washington, DC: Manual of Clinical Microbiology (10th Edition, pp. 658-665). ASM Press.
<https://doi.org/10.1128/9781555816728.ch38>

Hossain, S., Heo, G. J. 2021. **Ornamental fish: a potential source of pathogenic and multidrug-resistant motile *Aeromonas* spp.** *Letters in Applied Microbiology*, 72(1), 2-12. <https://doi.org/10.1111/lam.13373>.

Huys, G., Pearson, M., Kämpfer, P., Denys, R., Cnockaert, M., Inglis, V., Swings, J. (2003). ***Aeromonas hydrophila* subsp. *ranae* subsp. nov., isolated from septicemic farmed frogs in Thailand**. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(3), 885-891. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02357-0> .

Igbinosa, I. H. 2014. **Antibiogram profiling and pathogenic status of *Aeromonas* species recovered from Chicken**. *Saudi journal of biological sciences*, 21(5), 481-485. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.06.003> .

Jacobs, L., Chenia, H. Y. 2007. **Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African aquaculture systems**. *International journal of food microbiology*, 114(3), 295-306.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.030> .

Janda, J. M. Abbott, S. L. 2010. **The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection.** *Clinical microbiology reviews*, 23(1), 35-73. <http://doi.org/10.1128/CMR.00039-09>.

Johnson, P. T., Paull, S. H. 2011. **The ecology and emergence of diseases in fresh waters.** *Freshwater Biology*, 56(4), 638-657. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2010.02546.x> .

Jung S.V., Jung, A., Ryll, M., Bauer, J., Teitge, F., Steinhagen, D. 2019. **Diagnostic methods for identifying different *Aeromonas* species and examining their pathogenicity factors, their correlation to cytotoxicity and adherence to fish mucus.** *Journal of fish diseases*, 42(2), 189-219. <https://doi.org/10.1111/jfd.12917>

Kačániová M., Terentjeva, M., Klůga A., Březinová M. Kádasi M. 2019. **Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry based identification of the fish gut microbiota.** *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, 9(1), 151-155. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2019.9.1.151-155> .

Kimura M. 1980. **A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences.** *Journal of Molecular Evolution* 16(2), 111-120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>

Klontz, G. 1991. **Manual for rainbow trout production on the family-owned.** Moscow: Department of Fish and Wildlife Resources, University of Idaho. 70 pp.

Kondera, E., Ługowska, K. Sarnowski, P. **High affinity of cadmium and copper to head kidney of common carp (*Cyprinus carpio* L.).** *Fish Physiology and Biochemistry* 40, 9–22 (2014). <https://doi.org/10.1007/s10695-013-9819-1>

Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. 2018. **MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms.** *Molecular Biology and Evolution* 35(6):1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.

Laith, A. R., Najiah, M. 2013. ***Aeromonas hydrophila*: antimicrobial susceptibility and histopathology of isolates from diseased catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell).** *Journal of Aquaculture Research and Development*, 5(2), 1-7. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000215>.

Lee, H. J., Hoel, S., Lunestad, B. T., Lerfall, J., Jakobsen, A. N. 2021. ***Aeromonas* spp. isolated from ready-to-eat seafood on the Norwegian market: prevalence, putative virulence factors and antimicrobial resistance.** *Journal of Applied Microbiology*, 130(4), 1380-1393. <https://doi.org/10.1111/jam.14865>.

Lewbart, G. A. 2001. **Bacteria and ornamental fish.** *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 10(1), 48-56). <https://doi.org/10.1053/saep.2001.19543>.

Liu, D. 2015. ***Aeromonas*.** *Molecular Medical Microbiology*, 2, 1099-1110. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00061-5>.

Liu, X., Shi, H., Liu, Z., Wang, J., Huang, J. 2019. **Effect of heat stress on heat shock protein 30 (Hsp30) mRNA expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 19(8), 681-688. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v19_8_06

Miyagi, K., Hirai, I., Sano, K. 2016. **Distribution of *Aeromonas* species in environmental water used in daily life in Okinawa Prefecture, Japan.** *Environmental health and preventive medicine*, 21(5), 287-294. <https://doi.org/10.1007/s12199-016-0528-0>.

Moreno, A.A., López M., S., Corcho B. A. 2000. **Principales medidas en epidemiología.** *Salud pública de México*, 42(4), 337-348.

Mzula, A., Wambura, P. N., Mdegela, R. H., Shirima, G. M. 2019. **Phenotypic and molecular detection of *Aeromonads* infection in farmed Nile Tilapia in Southern**

highland and Northern Tanzania. Heliyon, 5(8), 1-8.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02220>.

National Center of Biotechnology (NCBI).(2020). **Standard Nucleotide BLAST.** Disponible en:
https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome. (Accesada en Noviembre de 2020).

Noonin, C., Jiravanichpaisal, P., Söderhäll, I., Merino, S., Tomás, J. M., Söderhäll, K. 2010. **Melanization and pathogenicity in the insect, *Tenebrio molitor*, and the crustacean, *Pacifastacus leniusculus*, by *Aeromonas hydrophila* AH-3.** *PLoS One*, 5(12).

Oh, W. T., Kim, J. H., Jun, J. W., Giri, S. S., Yun, S., Kim, H. J., Park, S. C. 2019. **Genetic characterization and pathological analysis of a novel bacterial pathogen, *Pseudomonas tructae*, in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Microorganisms*, 7(10), 432.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms7100432> .

OIE. 2022. Código Sanitario para los Animales Acuáticos. **Bioseguridad para los establecimientos de acuicultura.**

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2006. **Manual de piscicultura.** Disponible en:
https://www.fao.org/fishery/docs/CDrom/FAO_Training/FAO_Training/General/t0581s/Index.htm. (Accesada en Mayo del 2023).

Organización Mundial de Salud Animal (OMSA). 2022. **Aquatic code.** Disponible en:
https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/aquatic-code-online-access/?id=169&L=1&htmlfile=chapitre_aquatic_animal_waste.htm (Accesada en Mayo del 2023).

Ortega, C., Muzquiz, J. L., Fernández, A., Ruiz, I., De Blas, I., Simon, M. C., Alonso, J. L. 1996. **Water quality parameters associated with *Aeromonas* spp-affected hatcheries.** *Veterinary research*, 27(6), 553-560.

Pablos, M., Huys, G., Cnockaert, M., Rodríguez, C.J. M., Otero, A., Santos, J. A., García, L. M. L. 2011. **Identification and epidemiological relationships of *Aeromonas* isolates from patients with diarrhea, drinking water and foods.** *International journal of food microbiology*, 147(3), 203-210.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.006>

Pękala-Safińska, A. 2018. **Contemporary threats of bacterial infections in freshwater fish.** *Journal of veterinary research*, 62(3), 261-267.
<https://doi.org/10.2478/jvetres-2018-0037> .

Pessoa, R. B. G., de Oliveira, W. F., Marques, D. S. C., Dos Santos C. M. T., de Carvalho, E. V. M. M., Coelho, L. C. B. B. 2019. **The genus *Aeromonas*: A general approach.** *Microbial pathogenesis*, 130, 81-94.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.02.036>.

Piotrowska, M., Przygodzińska, D., Matyjewicz, K., Popowska, M. 2017. **Occurrence and variety of β -lactamase genes among *Aeromonas* spp. isolated from urban wastewater treatment plant.** *Frontiers in microbiology*, 8, 863.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00863> .

Praveen, P. K., Debnath, C., Shekhar, S., Dalai, N., Ganguly, S. 2016. **Incidence of *Aeromonas* spp. infection in fish and chicken meat and its related public health hazards: A review.** *Veterinary world*, 9(1), 6–11.
<https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.6-11> .

Preena, P. G., Dharmaratnam, A., Jayadradhan Rejish Kumar, V., Swaminathan, T. R. 2021. **Plasmid-mediated antimicrobial resistance in motile aeromonads from**

diseased Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Research*, 52(1), 237-248. <https://doi.org/10.1111/are.14886>.

Preena, P. G., Swaminathan, T. R., Kumar, V. J. R., Singh, I. S. B. 2020. **Antimicrobial resistance in aquaculture: A crisis for concern.** *Biología*, 1497–1517. <https://doi.org/10.2478/s11756-020-00456-4>.

Řehulka, J. 2002. **Aeromonas causes severe skin lesions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): clinical pathology, haematology, and biochemistry.** *Acta Veterinaria Brno*, 71(3), 351-360.

Reyes ,R. N. E., Salgado, M. C., Flores, V. I. T., González, G. M., Soriano, V. E., Pelaez, A. A., Vega S. V. 2019. **Molecular Identification and Virulence Potential of the Genus *Aeromonas* Isolated from Wild Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Mexico.** *Journal of food protection*, 82(10), 1706-1713. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-545> .

Ritola, O., Kiuru, T., Koponen, K., Mölsä, H., Hänninen, O., Lindström-Seppä, P. 1999. **Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to oxygen supersaturation and handling stress: plasma cortisol and hepatic glutathione status.** *Acta biologica Hungarica*, 50(1-3), 215–227.

Ruiz L. A., Hernández G.R., León, G. D., Francisco, J. Ramírez H. A. L. 2017. **Potential distribution of endangered Mexican golden trout (*Oncorhynchus chrysogaster*) in the Rio Sinaloa and Rio Culiacan basins (Sierra Madre Occidental) based on landscape characterization and species distribution models.** *Environmental Biology of Fishes*, 100(8), 981-993. <https://doi.org/10.1007/s10641-017-0624-z>.

Saengsitthisak, B., Chaisri, W., Punyapornwithaya, V., Mektrirat, R., Klayraung, S., Bernard, J. K., Pikulkaew, S. 2020. **Occurrence and Antimicrobial Susceptibility Profiles of Multidrug-Resistant *Aeromonads* Isolated from Freshwater**

Ornamental Fish in Chiang Mai Province. *Pathogens*, 9(11), 973.
<https://doi.org/10.3390/pathogens9110973>.

Saitou N. Nei M. 1987. **The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees.** *Molecular Biology and Evolution* 4(4):406-425.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>.

Salem, M., Zharan, E., Saad, R., Zaki, V. 2020. **Prevalence, molecular characterization, virulotyping, and antibiotic resistance of motile aeromonads isolated from Nile tilapia farms at northern Egypt.** *Mansoura Veterinary Medical Journal*, 21(1), 56-67. <https://doi.org/10.21608/mvmj.2020.21.108>

Salgado, M.C., Palomares, E., Jurado, M., Marín A., Vega, F., Soriano V.E. 2010. **Isolation and distribution of bacterial flora in farmed rainbow trout from Mexico.** *Journal of aquatic animal health*, 22(4), 244-247. <http://dx.doi.org/10.1577/H09-004.1>

Sandner, M. L., Vinuesa, P., Cravioto, A., Morales E. R. 2018. **The genomic basis of intrinsic and acquired antibiotic resistance in the genus *Serratia*.** *Frontiers in microbiology*, 9, 828. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00828> .

Secretaria de Pesca. **PROYECTO de Norma Oficial Mexicana NOM-020-PESC-1993, Que acredita las técnicas para la identificación de agentes patógenos causales de enfermedades en los organismos acuáticos vivos cultivados, silvestres y de ornato en México.** Disponible en: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4773063&fecha=07/12/1994#gsc.tab=0. (Accesada en Mayo de 2023).

Segner, H., Sundh, H., Buchmann, K., Dourfils, J., Sundell, K. S., Mathieu, C., Vaughan, L. (2012). **Health of farmed fish: its relation to fish welfare and its utility as welfare indicator.** *Fish physiology and biochemistry*, 38, 85-105.
10.1007/s10695-011-9517-9

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C (CIAD). 2003. **Manual de Buenas Prácticas de Producción Acuícola de Trucha para la Inocuidad Alimentaria**. ISBN: 968-5384-05-3.

Shayo, S. D., Mwita, C. J., Hosea, K. M. 2012. **Virulence of *Pseudomonas* and *Aeromonas* bacteria recovered from *Oreochromis niloticus* (Perege) from Mtera hydropower Dam; Tanzania**. *Annals of Biological Research*, 3(11), 5157-5161.

Stone, N. M., Thomforde, H. K. 2004. **Understanding your fish pond water analysis report** Cooperative Extension Program, University of Arkansas at Pine Bluff, US Department of Agriculture and county governments cooperating. pp. 1-4.

Stratev, D., Odeyemi, O. A. 2016. **Antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from different food sources: A mini-review**. *Journal of infection and public health*, 9(5), 535-544. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2015.10.006>

Syrova, E., Kohoutova, L., Dolejska, M., Papezikova, I., Kutilova, I., Cizek, A., Palikova, M. 2018. **Antibiotic resistance and virulence factors in mesophilic *Aeromonas* spp. from Czech carp fisheries**. *Journal of applied microbiology*, 125(6), 1702-1713. <https://doi.org/10.1111/jam.14075> .

Taylor, J. C., Miller, J. M. 2001. **Physiological performance of juvenile southern flounder, *Paralichthys lethostigma* (Jordan and Gilbert, 1884), in chronic and episodic hypoxia**. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 258(2), 195-214. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(01\)00215-5](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(01)00215-5) .

Timmons, M. B., Ebeling, J. M. 2010. **Recirculating aquaculture**. Ithaca, NY: Cayuga Aqua Ventures. 948 pp.

Universidad de Zaragoza. (2006) **Win Epi**. Disponible en: <http://winepi.net/sp/index.htm>. (Accesada en Enero de 2020).

Vega, S. V., Latif, E. F., Soriano, V.E., Beaz, H.R., Figueras, M. J., Aguilera, A. M. G., Castro E. G. 2014. **Re-identification of *Aeromonas* isolates from rainbow trout and incidence of class 1 integron and β -lactamase genes.** *Veterinary microbiology*, 172(3-4), 528–533. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.06.012> .

Waldrop, T., Summerfelt, S., Mazik, P., Kenney, P. B., Good, C. 2020. **The effects of swimming exercise and dissolved oxygen on growth performance, fin condition and survival of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*.** *Aquaculture Research*, 51(6), 2582-2589. <https://doi.org/10.1111/are.14600>

Wang, Y., Liu, H., Zhang, L., Sun, B. 2021. **Application of modified carbapenem inactivation method and its derivative tests for the detection of carbapenemase-producing *Aeromonas*.** *Infection and Drug Resistance*, 14, 3949. <https://doi.org/10.2147/IDR.S330115>.

Wanja, D. W., Mbutia, P. G., Waruiru, R. M., Mwadime, J. M., Bebora, L. C., Nyaga, P. N., Ngowi, H. A. 2020. **Fish husbandry practices and water quality in central Kenya: potential risk factors for fish mortality and infectious diseases.** *Veterinary medicine international*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/6839354> .

Welker, T. L., Overturf, K., Abernathy, J. 2019. **Effect of aeration and oxygenation on growth and survival of rainbow trout in a commercial serial-pass, flow-through raceway system.** *Aquaculture Reports*, 14, 100194. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100194> .

Wheathon, F.W. (1993). **Acuacultura, diseño y construcción de sistemas.** México: A. G. T. Editor S.A., México.704 p.

Wilhelms, M., Vilches, S., Molero, R., Shaw, J. G., Tomás, J. M., Merino, S. 2009. **Two redundant sodium-driven stator motor proteins are involved in *Aeromonas hydrophila* polar flagellum rotation.** *Journal of bacteriology*, 191(7), 2206-2217.

Wu, C. J., Ko, W. C., Lee, N. Y., Su, S. L., Li, C. W., Li, M. C., Chen, P. L. 2019. ***Aeromonas* isolates from fish and patients in Tainan City, Taiwan: genotypic and phenotypic characteristics.** *Applied and environmental microbiology*, 85(21), e01360-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.01360-19>.

Zdanowicz, M., Mudryk, Z. J., Perliński, P. 2020. **Abundance and antibiotic resistance of *Aeromonas* isolated from the water of three carp ponds.** *Veterinary research communications*, 44(1), 9-18. <https://doi.org/10.1007/s11259-020-09768-x>.

Zepeda V.A.P., Vega S.V., Ortega S.C., Rubio G.M., Oca M.D.M., Soriano V.E. 2017. **Pathogenicity of Mexican isolates of *Aeromonas* sp. in immersion experimentally infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792).** *Acta tropica*, 169:122-124. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.02.013>.

ARTÍCULO CIENTÍFICO:

“Bacterial and parasite co-infection in Mexican golden trout (*Oncorhynchus chrysogaster*) by *Aeromonas bestiarum*, *Aeromonas sobria*, *Plesiomonas shigelloides* and *Ichthyobodo necator*”

CASE REPORT

Open Access



Bacterial and parasite co-infection in Mexican golden trout (*Oncorhynchus chrysogaster*) by *Aeromonas bestiarum*, *Aeromonas sobria*, *Plesiomonas shigelloides* and *Ichthyobodo necator*

María Anel Fuentes-Valencia¹, José Luis Osornio-Esquivel¹, Carlos Antonio Martínez Palacios², José Luis Contreras-Ávila³, Erik Barriga-Tovar³, Genoveva Ingle-de la Mora^{4,5}, Andrés Arellano-Torres^{4,5}, Víctor Manuel Baizabal-Aguirre¹, Alejandro Bravo-Patiño¹, Marcos Cajero-Juárez^{1,2} and Juan José Valdez Alarcón^{1*} 

Abstract

Background: Bacterial infections are responsible of high economic losses in aquaculture. Mexican golden trout (*Oncorhynchus chrysogaster*) is a threatened native trout species that has been introduced in aquaculture both for species conservation and breeding for production and for which no studies of bacterial infections have been reported.

Case presentation: Fish from juvenile stages of Mexican golden trout showed an infectious outbreak in a farm in co-culture with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), showing external punctiform red lesions around the mouth and caudal pedunculus resembling furuncles by *Aeromonas* spp. and causing an accumulated mortality of 91%. Isolation and molecular identification of bacteria from lesions and internal organs showed the presence of *Aeromonas bestiarum*, *Aeromonas sobria*, *Plesiomonas shigelloides* and *Ichthyobodo necator* isolated from a single individual. All bacterial isolates were resistant to amoxicillin-clavulanic acid and cefazoline. *P. shigelloides* was resistant to third generation β -lactamics.

Conclusions: This is the first report of coinfection by *Aeromonas bestiarum*, *Aeromonas sobria*, *Plesiomonas shigelloides* and *Ichthyobodo necator* in an individual of Mexican golden trout in co-culture with rainbow trout. Resistance to β -lactams suggests the acquisition of genetic determinants from water contamination by human- or livestock-associated activities.

(Continued on next page)

*Correspondence: jose.alarcon@umich.mx; jivaldezalarcon@gmail.com

¹ Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mexico

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2022 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

(Continued from previous page)

Highlights

1. This is the first report of a coinfection by *Aeromonas bestiarum*, *Aeromonas sobria*, *Plesiomonas shigelloides* and the ectoparasite *Ichthyobodo necator* in a Mexican golden trout (*Oncorhynchus chrysogaster*), a threatened native species.
2. The antibiotic resistance profiles suggest the influence of the water source contaminated by human activities.

Keywords: Salmonids, *Oncorhynchus chrysogaster*, Bacterial coinfection, Antimicrobial resistance

Background

Mexico has a high diversity of endemic trout species which are considered the most southerly salmonids compared to the natural distribution of other salmonids [1–3]. Mexican golden trout (*Oncorhynchus chrysogaster*) is a native species living at heights greater than 1900 m over the sea level, in the basins of the Sinaloa, Culiacán and El Fuerte rivers in the Sierra Madre Occidental in México. Mexican golden trout is the most important source of food protein for surrounding human populations [1, 4]. Mexican golden trout is considered either a threatened or a near threatened native species by International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN) [4] or national NOM-059-SEMARNAT-2010 [5] regulatory organisms, respectively. The threatened condition is due to deforestation, habitat degradation, climate change and overexploitation [2]. Another threat for Mexican golden trout is the current hybridization with an exotic salmonid, the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) which is considered one of the more harmful to native fish exotic species [4, 6].

The genetic background of native trout provides this species with a unique adaptation to environment that are not favourable to other salmonids, so commercial breeding programs have been proposed [1, 2] to avoid loss of genetic background for the native species [7, 8]. Important threats for aquaculture are also illnesses; accounting for 50% of the decrease in production, being those caused by bacteria the most significant [9, 10].

Aeromonas spp. are important pathogens for aquaculture [11]. They are Gram-negative, oxidase positive bacilli [12]. All species but *A. media* and *A. salmonicida* are motile due to the presence of a polar flagellum and all are ubiquitous of brackish water and freshwaters [13]. *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* biovar *sobria*, *A. veronii* biovar *veronii*, *A. dhakensis*, *A. encheleia*, *A. allosaccharophila*, *A. schubertii*, *A. bestiarum*, *A. sobria*, *A. piscicola* and *A. jandaei* have been reported as pathogens in fish culture [14–16]. Particularly important are *A. hydrophila*, *A. caviae* and *A. veronii* which cause sepsis and ulcerative syndrome with a high economic impact on production [17]. *A. salmonicida* has been recognized as the causal agent of the so-called “Ulcer

disease” or “Red-Sore disease” [18] which may reach mortalities to about 90% in fish farms [19]. To date, there are no reports of *Aeromonas* spp.-related disease in Mexican golden trout.

Plesiomonas shigelloides is also a Gram-negative, oxidase positive, motile Enterobacteriaceae [20]. Along with *Aeromonas* spp. and *Fusobacterium mortiferum*, they are common pathogens in the gastrointestinal tract of freshwater fish from orders Perciformes (*Micropterus salmoides*, *Lepomis macrochirus*), Siluriformes (*Hypostomus auroguttatus*, *Ictalurus punctatus*, *Pimeolodus maculatus*), Salmoniformes (*O. mykiss*) and Characiformes (*Prochilodus argenteus*) among others [21–23]. In rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *P. shigelloides* infections have been associated with thin, weak, 1–2 year old fish showing yellowish exudate from anus, petechiae and ascites in internal organs and 40% mortality [24]. In grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) *P. shigelloides* causes muscular erosion [25] while in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) 60% mortality showing exophthalmia and diffuse haemorrhagic spots [26]. In ornamental cichlids *P. shigelloides* may cause up to 100% mortality [27].

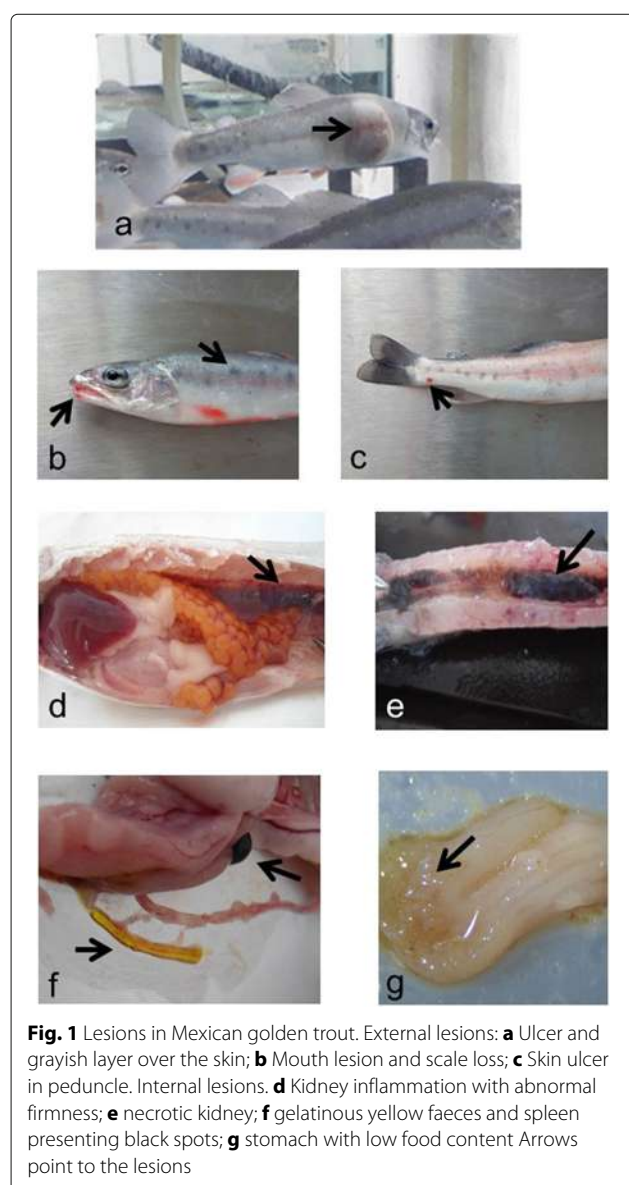
Infestations by parasites from the genus *Ichthyobodo*, have been reported in salmonids from the genus *Oncorhynchus* [9, 28–33]. In particular, *Ichthyobodo necator* can cause mortalities of up to 40% [28, 32]. Fish showing Ichthyobodosis usually show a grayish layer over the skin, loss of epidermis and small ulcers, which have been related to secondary infections [34]. The goal of the present study was to identify bacteria associated with an apparent outbreak of Red-Sore disease in a farm cultivating both Mexican golden trout and rainbow trout.

Case presentation

Case history

In a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) production farm in the municipality of Pucuto, in the State of Michoacán de Ocampo, México, located at 19°39'N, 100°45'O and 2,511 m.a.s.l., Mexican golden trout (*Oncorhynchus chrysogaster*) is also cultivated as an experimental approach for domestication and farming. Rainbow trout is cultivated in concrete tanks fed with water from the “El Retranque” dam in Pucuto. This facility also

contains an experimental area with PVC gutters and glass aquariums. The water source for this area is from a spring shared with the nearest human settlement in the town of Pucuto. In September, 2019, the experimental Mexican golden trout showed an outbreak of an infectious disease with a duration of 35 days that caused 91% of accumulated mortality, with 12 of 131 individuals surviving. On the 33rd day, 6 specimens were collected with mean lengths and weights of 11.33 cm and 53.9 g, respectively. The specimens were transported to the laboratory alive for clinical descriptions of pathological signs and microbiological analysis. Specimens showed normal swimming with preferential location at the borders of the container. Red and inflamed lesions were observed in the abdomen and mouth, fins were haemorrhagic and gills were inflamed



with petechiae (Fig. 1). An ectoparasite, *Ichthyobodo necator*, was identified from fresh samples of skin and gills. Stomachs showed low content of chyme. The bowel showed either soft brown (4 individuals) or gelatinous yellow (2 individuals) faeces. Gallbladders were yellow. Spleens with black spots, abnormal firmness and presence of fat. Kidneys showed mild inflammation, abnormal firmness and in one individual it was necrotic. For microbiological analysis, samples from skin, inflamed fins, gelatinous faeces, kidney, spleen, brain, heart and gallbladder were collected with a cotton swab [35] and plated in rich (Soybean Trypticase, Brain-Heart Infusion) and selective (McConkey, *Salmonella-Shigella*, Cefsulodin-irgasan-novobiocin – CIN –, Cetrimide, Glutamate-starch-phenol red – GSP – and Sabourad) solid culture media. Isolates were obtained from rich media and GSP agar which is a selective medium for *Aeromonas* spp. Since signs were similar to Red Sore Disease, we proceed to analyse only GSP agar isolates for the search of *Aeromonas* spp.

At the 3rd, 5th and 7th day of the beginning of the outbreak, the volume of water in the tanks was reduced to 50% and 25 ml/l of 10% of commercial aldehyde product (Paraguard, Seachem) were added. On day 8 and 10, 25mg/l of kanamycin sulfate (Knaplex, Seachem) was applied. From days 12th to 16th, 20 mg/l of a mixture of Sulfamethoxypyridacin (125 mg), Trimethoprim (25 mg) and tylosine (30 mg) per g of product (Koryn Triple, Tornel). On days 17 to 19, Knaplex was applied again but mixed with 10 g/l NaCl. From days 21 to 28, oxytetracycline (20 mg/kg of fish weight) was applied until mortality stopped. Florfenicol (Florfen 10, Preveson) 10 mg/kg of live weight was then incorporated in the food for 6 additional days, until fish do not take the food anymore.

Bacterial isolation was performed as described in Whitman et al. (2004). Liver, spleen and kidney from five individuals with Red Sore disease signs were aseptically collected and samples were inoculated in GSP culture medium which is selective for the genus *Aeromonas*. Yellow colonies formed by Gram-negative oxidase positive bacilli were further analysed for motility and glucose fermentation. Isolates that fit to *Aeromonas* spp. phenotype were stored in Brain-Heart infusion (BHI) added with 15% glycerol at -75°C for further characterization. Molecular identification of presumptive *Aeromonas* spp. isolates was performed by sequencing an 820 bp fragment from *rpoD* gene [36]. Sequences were obtained from Macrogen (Korea) and assembled with Unipro UGENE v39.0 sequence assembly software v5.15 [37]. Sequences were registered under GenBank numbers MZ668583 (RSDI-X6), MZ668586 (RSDI-P6), MZ668585 (RSDI-R6) and MZ668584 (RSDI-Q6). Similarity search was performed with Basic Local Alignment Research Tool (BLAST) at the National Center of Biotechnology Information (NCBI, USA). Four bacterial isolates were obtained. Two of them

correspond to *Aeromonas bestiarum* isolated from oral lesion (RSDI-X6) and spleen (RSDI-P6) with 99.27% and 99.05% of sequence identity for each sequence. One isolate (RSDI-R6) sequence was 98.61% identical to *Aeromonas sobria* isolated from kidney, and the last one (RSDI-Q6) showed also 99.29% identity with a *P. shigelloides* sequence and was isolated from spleen. Isolates RSDI-P6, RSDI-R6 and RSDI-Q6 were recovered from the same individual. To assess evolutionary relatedness of the bacterial species, a similarity tree (Fig. 2) was constructed using MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version X software [38]. Evolutionary relatedness was inferred using the Neighbour joining method [39]. Confidence values were estimated with a bootstrap test with 1000 replicates [40] and evolutionary distances with the Kimura-2 parameter method [41]. Figure 2 shows strong evolutionary relatedness of our *A. bestiarum* (RSDI-X6, RSDI-P6, 100% of confidence) and *A. sobria* (RSDI-R6, 100% of confidence) isolates with reference sequences. Isolate RSDI-Q6 identified as *P. shigelloides*, also associated with a reference sequence with 100% of confidence.

Antimicrobial sensitivity tests were performed according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, USA) manuals M45 and M100 for disk diffusion tests [42, 43]. Isolates were tested against 21 antibiotics at their specified concentration (Table 1). Briefly, 24 h cultures at 28°C were adjusted to an OD_{610nm} of 0.5–0.7 and plated with a cotton swab in Muller-Hinton agar over which sensidiscs (Oxoid) were placed. After 24h, the inhibition zone was measured with a Vernier calibrator. The three *Aeromonas* spp. isolates were resistant or intermediate resistant to Amoxicillin-clavulanic acid, ampicillin-sulbactam, ceftazolin and ceftiofloxacin. RSDI-X6 and RSDI-P6 *A. bestiarum* isolates were resistant to piperacillin-tazobactam while *A. sobria* (RSDI-R6) showed intermediate susceptibility. The three *Aeromonas* spp. Isolates were resistant to carbapenems (ertapenem, imipenem, meropenem). *Aeromonas* spp. Isolates were sensitive to cefepime, cefotaxime, ceftazidime, ceftiofloxacin, cefuroxime sodium, aztreonam, tetracycline, ciprofloxacin, levofloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole and chloramphenicol.

P. shigelloides (RSDI-Q6) isolate showed resistance to ceftazolin, cefotaxime, meropenem, amikacin, gentamicin, intermediate resistance to amoxicillin-clavulanic acid, ceftazidime and meropenem, and was sensitive to the rest of the antibiotics.

For the identification of ectoparasites, wet mount examination of gill clips and skin scrapes taken from several sites on the fish were examined by light microscopy. *I. necator* was identified in skins and gills samples. Due to the high mortality rate and the late moment in which samples were collected for analysis, it was not possible to analyse healthy fish from this outbreak for the search of

ectoparasites. However, in August 2018, in sick rainbow trout from the same farm, *A. hydrophila*, *A. sobria*, or *A. allosaccharophyla* were isolated from internal organs, but no ectoparasites were observed. In December 2018, neither of the above-mentioned bacteria nor ectoparasites, were found in healthy fish from the same farm.

Discussion and conclusions

Although Mexican golden trout is an endangered species ongoing transition to commercial exploitation, no research is available on its bacterial pathogens. This is the first report of coinfection of Mexican golden trout with *A. bestiarum*, *A. sobria*, *P. shigelloides* and the ectoparasite *Ichthyobodo necator*.

I. necator is a common parasite of the genus *Oncorhynchus*, infesting species such as *O. mykiss*, *O. tshawytscha*, *O. masou*, *O. gorbuscha*, *O. keta* y *O. nerka* [9, 28–33]. In this report, *A. bestiarum* RSDI-X6 was isolated from an external lesion. Epithelial destruction by ectoparasites causes an imbalance in osmoregulation followed by hyperplasia and lamellar fusion of the gills followed by respiratory malfunction [28, 44]. Synergistic effects of ectoparasites and bacteria co-infecting salmonids, have been described [45–47], but has also been suggested that ectoparasites may act as vectors of bacteria in fish infections [48–50]. Further studies are necessary to demonstrate that *I. necator* has a role as a vector of bacterial infections in Mexican golden trout.

Aeromonas spp. are well known to cause high mortality in salmonids [18, 51]. In the aquatic environment, fish are exposed to a great variety of pathogens [52] with co-infections as a factor increasing susceptibility [53]. Co-infections can be a challenge for diagnosis and treatment [52]. To the best of our knowledge, there is only a report on bacterial co-infections for the genus *Oncorhynchus*. In a study of pathogen prevalence in Chinook salmon (*O. tshawytscha*) several bacterial pathogens were identified, but a significant association was only observed for *Renibacterium salmoninarum* and aeromonads; *R. salmoninarum* and *A. salmonicida* were the most abundant pathogens with prevalence values about 25% and 15%, respectively [54]. Bacterial co-infections are common in other fish species in aquaculture and may alter prevalence, severity and impact on fish disease or success of vaccination strategies due to the synergistic effect of the pathogens [53]. In Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), co-infections have been described with *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus iniae*, *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*, *A. hydrophila*, *P. shigelloides* and *Edwardsiella tarda* [55].

A. bestiarum, *A. sobria* and *P. shigelloides* identified in Mexican golden trout in this work, are common inhabitants of aquatic ecosystems. *Aeromonas* spp. and *P. shigelloides* are also considered as emergent pathogens of

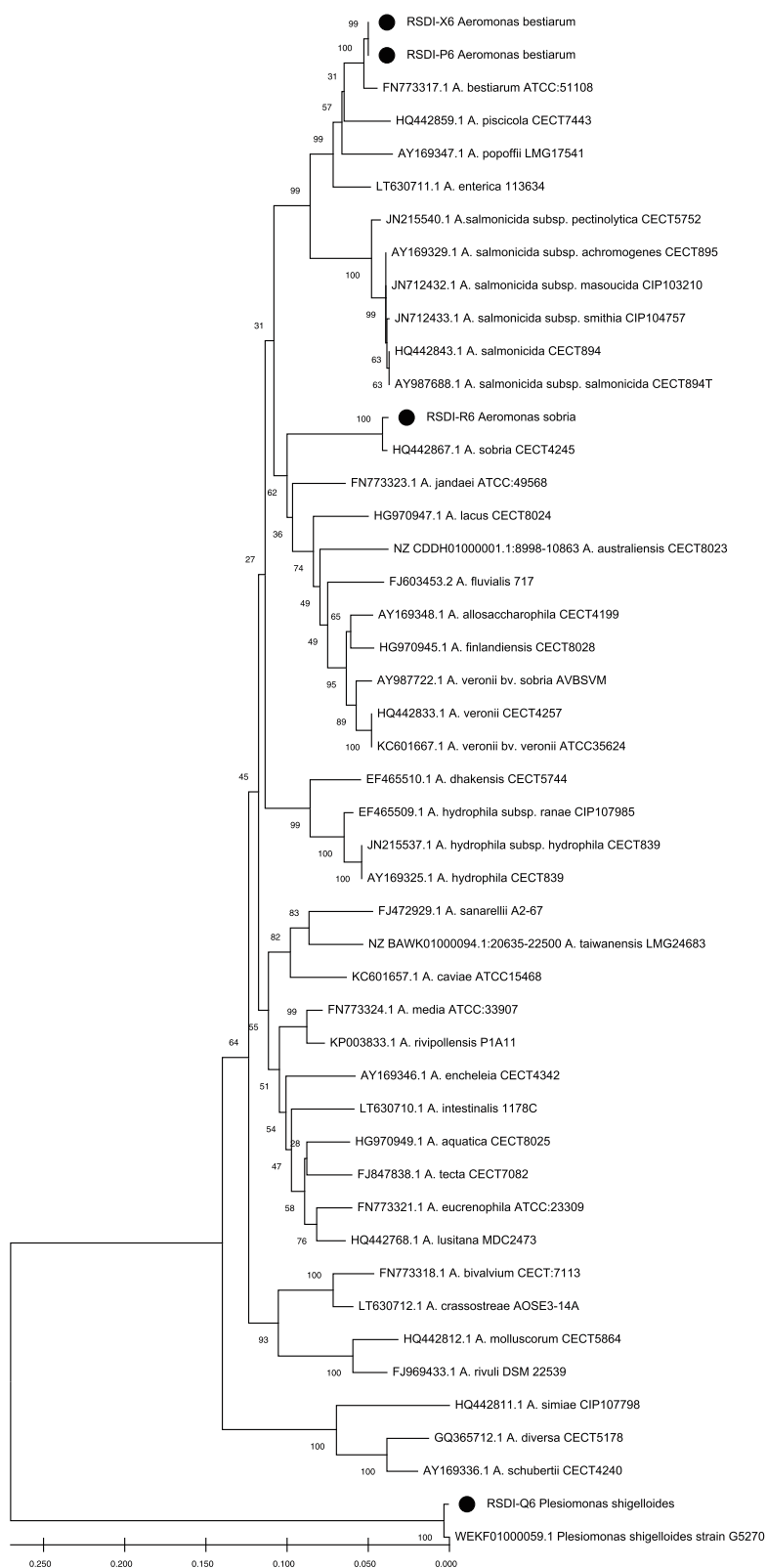


Fig. 2 Similarity tree of bacterial isolates. Black dots represent the position in the tree of the isolates reported in this work. Numbers in each node are the confidence values. Distance bar is the number of nucleotide substitutions per site

Table 1 Antibiotic sensitivity test results

Antimicrobial agent	Concentration (μg)	Isolates			
		RSDI-X6 <i>Aeromonas bestiarum</i>	RSDI-R6 <i>Aeromonas sobria</i>	RSDI-P6 <i>Aeromonas bestiarum</i>	RSDI-Q6 <i>Plesiomonas shigelloides</i>
		Interpretative criteria of sensitivity			
Penicillins in combination with other β-lactamics / β-lactamase inhibitors					
Amoxicillin- clavulanic acid	AMC 20/10	R	R	R	I
Ampicillin – sulbactam	SAM 10/10	R	R	R	S
Piperacillin – tazobactam	TZP 100/10	R	I	R	S
Cephalosporins					
Cefazolin	KZ 30	R	R	R	R
Cefepime	FEP 30	S	S	S	S
Cefotaxime	CTX 30	S	S	S	R
Cefoxitin	FOX 30	R	R	R	S
Ceftazidime	CAZ 30	S	S	S	I
Ceftriaxone	CRO 30	S	S	S	S
Cefuroxime sodium	CXM 30	S	S	S	S
Carbapenems					
Ertapanem	ETP 10	R	R	R	S
Imipenem	IPM 10	R	R	R	I
Meropenem	MEM 10	R	R	R	R
Monobactams					
Aztreonam	AZT30	S	S	S	S
Aminoglycosides					
Amikacin	AK 30	S	S	I	R
Gentamicin	CN 10	S	I	I	R
Tetracyclines					
Tetracycline	TE 30	S	S	S	S
Quinolones					
Ciprofloxacin	CIP 5	S	S	S	I
Levofloxacin	LEV 5	S	S	S	S
Folate pathway inhibitors					
Trimethoprim/sulfamethoxazole	SXT 1.25/23.75	S	S	S	S
Phenicol					
Chloramphenicol	C 30	S	S	S	S

intestinal and extraintestinal diseases [56–58]. *Aeromonas* spp. and *P. shigelloides* were previously isolated from fish, amphibians, molluscs, crustaceans, reptiles and mammals [12, 59–61]. *Aeromonas* spp. have been proposed as indicators of the presence and development of microbial resistance to antibiotics both in fish farms and natural environment, and as a potential source of transmission of resistance determinants to human pathogens, as they are zoonotic [58, 62]. *Aeromonas* spp. are also commonly found in vegetables, foods of animal origin, faeces of animal and human origin and contaminated water as important sources of transmission to humans [63]. In

intestinal outbreaks, frozen foods or insufficiently cooked meals have also been associated with *Aeromonas* spp. transmission [64]. In some foods, *Aeromonas* spp. cell densities may reach up to 10^5 bacteria·g⁻¹ or ml⁻¹ [57]. Due to the presence of antimicrobial resistance, virulence and biofilm producing gene markers in isolates from aquaculture and abattoir environments, *Aeromonas* spp. are becoming good indicators of water and food quality [65, 66].

P. shigelloides, previously classified as *Aeromonas shigelloides*, share several features with *Aeromonas* spp. It is also commonly found in foods of animal and plant origin [57].

P. shigelloides has high clinical relevance because it has been ranked as the third and fourth causes of gastroenteritis in Nigeria and China, respectively [67, 68], being water its most common source of transmission [64]. *P. shigelloides* may grow easily in a great variety of foods [57]. Ingestion of seafoods as oysters and uncooked fish meals have been associated with outbreaks of *P. shigelloides* infections [64]. So, since *Aeromonas* spp. and *P. shigelloides* are both considered as good indicators of food contamination and as emergent pathogens in aquaculture, the finding of these two pathogens in co-infection in an outbreak in Mexican golden trout suggest external contamination of water sources.

In this report three of the *Aeromonas* spp. isolates from Mexican golden trout were resistant to β -lactamic antibiotics, particularly to first and second generation cephalosporins (cefazolin and cefoxitin) and β -lactamase inhibitors (clavulanic acid and sulbactam). Amoxicillin and ampicillin resistance were also reported for rainbow trout (*O. mykiss*), tilapia (*O. mossambicus*) and Koi carp (*Cyprinus carpio*) *Aeromonas* spp. isolates in South Africa [69]. Resistance to β -lactams have been increasing in *Aeromonas* spp. from clinical and environmental origin [70, 71]. In México, *Aeromonas* spp. isolates from rainbow trout contained extended spectrum β -lactamases (ESBL) encoding genes (*bla_{SHV}* y *bla_{CphA/IMIS}*) [72]. *Aeromonas* spp. isolates from this report were susceptible to third generation cephalosporins and monobactam, suggesting the absence of ESBL gene determinants, as has been reported for trout, tilapia and Koi carp isolates [69]. Susceptibility to monobactams, tetracyclines, quinolones and phenicols in our *Aeromonas* spp. isolates are in accordance with a previous study [12].

Our *Plesiomonas shigelloides* isolate showed resistance and intermediate resistance to cefotaxime, ceftazidime respectively, third generation cephalosporins for which ESBL bacteria are resistant. ESBLs are common in *Escherichia coli* and other Enterobacteriaceae [73], which were found in isolates from intestinal samples in fish from India and Switzerland [74, 75]. Since third generation cephalosporins are not commonly recommended for treatment of bacterial infections in aquaculture, it is possible that ESBL genetic determinants may be mobilizing from contaminating enterobacteria from the environment that are horizontally transferring their genes to *P. shigelloides*. High prevalence of cephalosporin resistant *P. shigelloides* suggest also high level of contamination of water [76], although isolates from other sources (humans, dogs, aquarium) were susceptible to cephalosporins [77]. *P. shigelloides* isolate RSDI-Q6 also showed intermediate resistance to β -lactams (amoxicillin-clavulanic acid) and a first-generation cephalosporin (cefazolin). Resistance to a wide variety of β -lactams in *P. shigelloides* isolates is common [78]. This result is in contrast to that reported for

P. shigelloides isolates from tilapia which were susceptible to amoxicillin-clavulanic acid, ceftazidime and gentamicin [79]. These same authors also reported resistance to tetracycline and chloramphenicol, for which our isolate was susceptible. *Aeromonas* spp. and *P. shigelloides* isolates in this work were either resistant or intermediate-resistant to amoxicillin-clavulanic acid and cefazolin, a β -lactam/ β -lactamase inhibitor, a first-generation cephalosporin and carbapenems. Neither of these antibiotics are approved by the Food and Drug Administration from USA which are also applied in Mexican regulations, so genetic resistance may be acquired from other bacterial species from animal or human origin contaminating the water. Although it has been suggested that there may be some intrinsic resistance to these antibiotics for these species [79]; evidence is also reported that describe sensitive and resistant isolates both from clinical and environmental origin [80] for *Aeromonas* spp. It is suggested that variation in antimicrobial susceptibility may be due to different genetic backgrounds in the environment and the selective pressures by antibiotics contaminating the water sources [70], reinforcing the hypothesis that antibiotic resistance determinants in bacteria from aquatic environments may be a consequence of anthropogenic contamination [62]. The presence of *Aeromonas* spp. showing antibiotic resistance may be used as indicators of contamination in vulnerable aquatic environments [81]. According to this, presence of integrons and other mobile genetic elements are frequently found that encode antibiotic resistance determinants in *Aeromonas* spp. [82]. Antibiotics are commonly used in anthropogenic activities related to aquaculture, animal production and even in treatment of companion animals, so its presence is frequent in the environment and they become a risk for public health [83, 84]. Resistance to antibiotics not commonly used in aquaculture is also frequent in other fish pathogenic bacteria [85]. Antimicrobial resistance is considered an important health risk in aquaculture [86], particularly for Mexican golden trout and their cross breeds due to their threatened condition. This particular threat for Mexican golden trout is added to others as geographic isolation, habitat transformation, chemical contamination from pesticides and industrial and mining activities in the surrounding environment [87, 88].

This report describes the co-infection of *Aeromonas* spp. and *P. shigelloides* in a Mexican golden trout operation and outlines their antibiotic resistance to β -lactams and third generation cephalosporines which suggests an infection from contaminated waters. Due to the emerging importance of these bacterial species as environmental quality markers and as emergent zoonotic pathogens, it is important to make a continuous surveillance of these pathogens in aquaculture. To complement surveillance, it is necessary to perform studies on the presence of

virulence factors, haemagglutination patterns, infectivity in cellular models, and biofilm forming abilities, among others, to better understand the pathogenic potential of each isolate. Studies with multilocus sequence typing (MLST) [89] and macro-restriction analysis in pulse-field gel electrophoresis (PFGE) [90] will also help to understand *Aeromonas* pathogen diversity and the possible relation of particular clones as human or fish pathogens or as environmental strains [91]. Comparative genome analysis of our *Aeromonas* spp. and *P. shigelloides* isolates against others from different sources will also allow understanding differences in pathogenic potential and host specificity and how are they contributing to the co-infection process.

Abbreviations

GSP: Glutamate Starch Phenol red; BHI: Brain-heart infusion; BLAST: Basic Local Alignment Search Tool; NCBI: National Center for Biotechnology Information; CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute; FDA: Food and Drug Administration; IUCN: International Union for Conservation of Nature and Natural Resources; ESBL: Extended-spectrum β -lactamases

Acknowledgments

Authors wish to thank Carlos Antonio Ochoa Macedo and Jorge Andrés Suárez Ramírez for their contribution with microbiological characterization of isolates and María Eréndira Árciga Delgado and Mariana Dafne Moreno Basurto for their contribution for analysis and description of internal lesions and photography.

Authors' contributions

MAFV, CAMP, JLCA, and JJVA contributed with experimental design and to reach funding for the project; MAFV, EBT, GIM and AAT contributed with sample collection and case documentation and description; MAFV, JLOE and EBT contributed to microbial and ectoparasite isolation and identification; MAFV, JLOE, VMBA, ABP and MCJ contributed to molecular identification and data analysis and discussion; MAFV, CAMP, JLCA, and JJVA drafted the manuscript; all authors read and approved the final version of the manuscript.

Funding

The project was partially funded by a project from Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Alimentaria (SENASICA) to the Comité Estatal de Sanidad Acuicola de Michoacán (CESAMICH) to JJVA for an epidemiological survey of *Aeromonas* spp. in rainbow trout in Michoacán including study design, sample collection and microbiological analysis of the isolates. Partial funding from a project from the Laboratorio Nacional de Nutrigenómica Digestiva Animal to CAMP and a project from Coordinación de la Investigación Científica-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (CIC-UMSNH) to JJVA for molecular characterization and antibiotic resistance profiles of *Aeromonas* spp. isolates in rainbow trout; and from PLT Lab S.A.P.I. de C.V. in agreement with JJVA to implement molecular characterization and phylogenetic analysis of bacterial isolates.

Availability of data and materials

All data related to this study are included in this manuscript. Sequences obtained in the present study are available in the GenBank repository (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) under accession numbers: MZ668583 (RSDI-X6), MZ668586 (RSDI-P6), MZ668585 (RSDI-R6) and MZ668584 (RSDI-Q6).

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Ethical approval and consent of participation is not applicable to this study.

Consent for publication

The administrator of the farm in this case report gave written consent to publish the case in public.

Competing interests

JJVA has an agreement with PLT Lab S.A.P.I. de C.V. for the future development of molecular diagnosis and control solutions for animal, plant and human infectious diseases. All other authors declare no competing interests.

Author details

¹Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mexico. ²Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mexico. ³Comité Estatal de Sanidad e Inocuidad Acuicola de Michoacán A.C. (CESAMICH), Morelia, Mexico. ⁴Dirección General Adjunta de Investigación en Acuicultura, Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura, Pátzcuaro, Mexico. ⁵Centro Regional de Investigación Acuicola y Pesquera en Pátzcuaro, Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura, Pátzcuaro, Mexico.

Received: 16 August 2021 Accepted: 9 March 2022

Published online: 12 April 2022

References

- Hendrickson DA, Neely DA, Mayden RL, Anderson K, Brooks JE, Camarena RF, et al. Conservation of Mexican native trout and the discovery, status, protection and recovery of the Conchos trout, the first native. In: Lozano VMDL, Contreras BAJ, editors. Studies of North American desert fishes in honor of E.P. (Phil) Pister conservationist. Faculty of Biological Sciences. Mexico: Autonomous University of Nuevo León; 2006. p. 162–201.
- Barriga SIA, Arredondo FJL, Ingle MG, García L FJ. Estrategias acuícolas para la conservación de trucha nativa: primeras experiencias. 2016. <http://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1001/1364>. Accessed 20 May 2020.
- Ruiz LA, Hernández GR, García DLFJ, Ramírez HAL. Potential distribution of endangered Mexican golden trout (*Oncorhynchus chrysogaster*) in the Rio Sinaloa and Rio Culiacan basins (Sierra Madre Occidental) based on landscape characterization and species distribution models. Environ Biol Fish. 2017;100:981–93. <https://doi.org/10.1007/s10641-017-0624-z>.
- Hendrickson D, Tomelleri JR. *Oncorhynchus chrysogaster*. The IUCN Red List of Threatened Species 2019. 2019. <https://www.iucnredlist.org/species/142674122/145641611> Accessed 7 Jan 2020.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. 2010. https://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5173091. Accessed 3 Jan 2020.
- Global Invasive Species Database. 2020. <http://www.iucngisd.org/gisd/speciesname/Oncorhynchus+mykiss>. Accessed 08 Feb 2020.
- McGinnity P, Prodöhl P, Ferguson A, Hynes R, Maoiléidigh NÓ, Baker N, et al. Fitness reduction and potential extinction of wild populations of Atlantic salmon, *Salmo salar*, as a result of interactions with escaped farm salmon. Proc R Soc Lond. 2003;270(1532):2443–50. <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2520>.
- Escalante MA, García De León FJ, Dillman CB, De los Santos CAB, George A, Barriga SIÁ. Introgresión genética de la trucha arcoíris exótica en poblaciones de trucha dorada mexicana. In: García-De León FJ, editor. La trucha dorada mexicana. México: CIAD-CIBNOR; 2016. p. 125–36.
- Meyers TR. First report of erythrocytic inclusion body syndrome (EIBS) in chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* in Alaska, USA. Dis Aquat Org. 2007;76(2):169–72. <https://doi.org/10.3354/dao076169>.
- Assefa A, Abunna F. Maintenance of fish health in aquaculture: Review of epidemiological approaches for prevention and control of infectious disease of fish. Vet Med Int. 2018;2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5432497>.
- Food and Agriculture Organization (FAO). Major bacterial diseases affecting aquaculture. 2016. http://www.fao.org/fi/static-media/MeetingDocuments/WorkshopAMR/presentations/07_Haenen.pdf. Accessed 10 Dec 2017.
- Janda JM, Abbott SL. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. Clin Microbiol Rev. 2010;23(1):35–73. <https://doi.org/10.1128/CMR.00039-09>.

13. Chandrarathna HPSU, Nikapitiya C, Dananjaya SHS, Wijerathne CUB, Wimalasena SHMP, Kwun HJ, et al. Outcome of co-infection with opportunistic and multidrug resistant *Aeromonas hydrophila* and *A. veronii* in zebrafish: Identification, characterization, pathogenicity and immune responses. *Fish Shellfish Immunol.* 2018;80:573–81. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.06.049>.
14. Esteve C, Gutiérrez MC, Ventosa A. *Aeromonas encheleia* sp. nov., isolated from European eels. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1995;45(3):462–6. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-3-462>.
15. Austin B, Austin DA. Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish, 6th ed: Springer; 2012. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-32674-0>.
16. Zepeda VAP, Vega SV, Ortega SC, Rubio GM, Oca MDM, Soriano VE. Pathogenicity of Mexican isolates of *Aeromonas* sp. in immersion experimentally-infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792). *Acta Tropica.* 2017;169:122–4. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.02.013>.
17. Chaix G, Roger F, Berthe T, Lamy B, Jumas-Bilak E, Lafite R, et al. Distinct *Aeromonas* populations in water column and associated with copepods from estuarine environment (seine, France). *Front Microbiol.* 2017;8:1259. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01259>.
18. Menanteau-Ledouble S, Kumar G, Saleh M, El-Matbouli M. *Aeromonas salmonicida*: updates on an old acquaintance. *Dis Aquat Org.* 2016;120(1):49–68. <https://doi.org/10.3354/dao03006>.
19. Kirkan 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;50(7):339–42. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2003.00671.x>.
20. Janda JM, Abbott SL, McIver CJ. *Plesiomonas shigelloides* revisited. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29(2):349–74. <https://doi.org/10.1128/CMR.00103-15>.
21. Silva FCP, Brito MFG, Farias LM, Nicoli JR. Composition and antagonistic activity of the indigenous intestinal microbiota of *Prochilodus argenteus* Agassiz. *J Fish Biol.* 2005;67(6):1686–98. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2005.00877.x>.
22. Duarte S, Zauli DAG, Nicoli JR, Araújo FG. Gram-negative intestinal indigenous microbiota from two Siluriform fishes in a tropical reservoir. *Braz J Microbiol.* 2014;45(4):1283–92. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822014000400019>.
23. Larsen AM, Mohammed HH, Arias CR. Characterization of the gut microbiota of three commercially valuable warmwater fish species. *J Appl Microbiol.* 2014;116(6):1396–404. <https://doi.org/10.1111/jam.12475>.
24. Cruz JM, Saraiva A, Eiras JC, Branco R, Sousa JC. An outbreak of *Plesiomonas shigelloides* in farmed rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in Portugal. *Bull Eur Assoc Fish Pathol.* 1986;6:20–2.
25. Hu Q, Lin Q, Shi C, Fu X, Li N, Liu L, Wu S. Isolation and identification of a pathogenic *Plesiomonas shigelloides* from diseased grass carp. *Acta Microbiol.* 2014;54:229–35.
26. Behera BK, Bera AK, Paria P, Das A, Parida PK, Kumari S, et al. Identification and pathogenicity of *Plesiomonas shigelloides* in Silver Carp. *Aquac.* 2018;493:314–8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.063>.
27. Nisha RG, Rajathi V, Manikandan R, Prabhu NM. Isolation of *Plesiomonas shigelloides* from infected cichlid fishes using 16S rRNA characterization and its control with probiotic *Pseudomonas* sp. *Acta Sci Veterinariae.* 2014;42(1):1–7.
28. Urawa S, Awakura T. Protozoan diseases of freshwater fishes in Hokkaido. *Sci Rep Hokkaido Fish Hatch.* 1994;48:47–58.
29. Urawa S, Kusakari M. The survivability of the ectoparasitic flagellate *Ichthyobodo necator* on chum salmon fry (*Oncorhynchus keta*) in seawater and comparison to *Ichthyobodo* sp. on Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J Parasitol.* 1990;76:33–40. <https://doi.org/10.2307/3282624>.
30. Todt JA, Karlsbakk E, Isaksen TE, Plarre H, Urawa S, Mouton A, et al. *Ichthyobodo necator* (Kinetoplastida) a complex of sibling species. *Dis Aquat Org.* 2004;58(1):9–16. <https://doi.org/10.3354/dao058009>.
31. Callahan HA, Litaker RW, Noga EJ. Genetic relationships among members of the *Ichthyobodo necator* complex: implications for the management of aquaculture stocks. *J Fish Dis.* 2005;28(2):111–8. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2004.00603.x>.
32. Balta F, Balta ZD, Akhan S. Seasonal distribution of protozoan parasite infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in the Eastern Black Sea of Turkey. *Bull Eur Assoc Fish Pathol.* 2019;39:31–9.
33. Jensen HM, Karami AM, Mathiessen H, Al-Jubury A, Kania PW, Buchmann K. Gill amoebae from freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): *In vitro* evaluation of antiparasitic compounds against *Vannella* sp. *J Fish Dis.* 2020;43(6):665–72. <https://doi.org/10.1111/jfd.13162>.
34. Isaksen TE, Karlsbakk E, Sundnes GA, Nylund A. Patterns of *Ichthyobodo necator sensu stricto* infections on hatchery reared salmon (*Salmo salar* L.) in Norway. *Dis Aquat Org.* 2010;88:207–14. <https://doi.org/10.3354/dao02173>.
35. Whitman KA. *Finfish and shellfish bacteriology manual: techniques and procedures.* USA: Iowa state press; 2004.
36. Soler L, Yanez MA, Chacon MR, Aguilera AMG, Catalán V, Figueras MJ, et al. Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004;54:1511–9. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.03048-0>.
37. Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *J Bioinform.* 2012;28:1166–7. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>.
38. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol.* 2018;35:1547–9.
39. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987;4:406–25. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>.
40. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evol.* 1985;39:783–91. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>.
41. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 1980;16:111–20. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>.
42. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious Bacteria; approved guideline-second edition CLSI document M45-A2. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.
43. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 31st ed. CLSI supplement M100. USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2021.
44. Urawa S, Ueki N, Karlsbakk E. A review of *Ichthyobodo* infection in marine fishes. *Fish Pathol.* 1998;33(4):311–20. <https://doi.org/10.3147/jfsfp.33.311>.
45. Busch S, Dalsgaard I, Buchmann K. Concomitant exposure of rainbow trout fry to *Gyrodactylus derjavini* and *Flavobacterium psychrophilum*: effects on infection and mortality of host. *Vet Parasitol.* 2003;117(1–2):117–22. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.07.018>.
46. Bandilla M, Valtonen ET, Suomalainen LR, Aphalo PJ, Hakalahti T. A link between ectoparasite infection and susceptibility to bacterial disease in rainbow trout. *Int J Parasitol.* 2006;36(9):987–91. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.05.001>.
47. Arriagada G, Hamilton WC, Nekouei O, Foerster C, Müller A, Lara M, et al. *Caligus rogercresceyi* infestation is associated with *Piscirickettsia salmonis*-attributed mortalities in farmed salmonids in Chile. *Prev Vet Med.* 2019;171. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104771>.
48. Xu DH, Shoemaker CA, Klesius PH. *Ichthyophthirius multifiliis* as a potential vector of *Edwardsiella ictaluri* in channel catfish. *FEMS Microbiol Lett.* 2012;329(2):160–7. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02518.x>.
49. Novak CW, Lewis DL, Collicutt B, Verkaik K, Barker DE. Investigations on the role of the salmon louse, *Lepeophtheirus salmonis* (Caligidae), as a vector in the transmission of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *J Fish Dis.* 2016;39(10):1165–78. <https://doi.org/10.1111/jfd.12449>.
50. Hadfield KA, Smit NJ. Parasitic Crustacea as Vectors. In: Smit N, Bruce N, Hadfield K, editors. Parasitic Crustacea. Zoological Monographs. Cham: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-17385-2_7.
51. Fečkaninová A, Koščová J, Mudroňová D, Popelka P, Toropilova J. The use of probiotic bacteria against *Aeromonas* infections in salmonid aquaculture. *Aquac.* 2017;469:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.11.042>.
52. Ma J, Bruce TJ, Oliver LP, Cain KD. Co-infection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with infectious hematopoietic necrosis virus and *Flavobacterium psychrophilum*. *J Fish Dis.* 2019;42(7):1065–76. <https://doi.org/10.1111/jfd.13012>.
53. Abdel-Latif HM, Dawood MA, Menanteau-Ledouble S, El-Matbouli M. The nature and consequences of co-infections in tilapia: A review. *J Fish Dis.* 2020;43(6):651–64. <https://doi.org/10.1111/jfd.13164>.
54. Loch TP, Scribner K, Tempelman R, Whelan G, Faisal M. Bacterial infections of Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum),

- returning to gamete collecting weirs in Michigan. J Fish Dis. 2012;35(1): 39–50. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01322.x>.
55. Delphino MKVC, Leal CAG, Gardner IA, Assis GBN, Roriz GD, Ferreira F, et al. Seasonal dynamics of bacterial pathogens of Nile tilapia farmed in a Brazilian reservoir. Aquac. 2019;498:100–8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.023>.
56. Theodoropoulos C, Wong TH, O'Brien M, Stenzel D. *Plesiomonas shigelloides* enters polarized human intestinal Caco-2 cells in an *in vitro* model system. Infect Immun. 2001;69(4):2260–9. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.4.2260-2269.2001>.
57. Bhunia AK. Opportunistic and Emerging Foodborne Pathogens: *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*, *Cronobacter sakazakii*, and *Brucella abortus*. In: Foodborne Microbial Pathogens. New York: Springer; 2018. p. 343–50.
58. Borella L, Salogni C, Vitale N, Scali F, Moretti VM, Pasquali P, et al. Motile aeromonads from farmed and wild freshwater fish in northern Italy: an evaluation of antimicrobial activity and multidrug resistance during 2013 and 2016. Acta Vet Scand. 2020;62(1):1–8. <https://doi.org/10.1186/s13028-020-0504-y>.
59. 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(3):763–5. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572009000300021>.
60. Pu W, Guo G, Yang N, Li Q, Yin F, Wang P, et al. Three species of *Aeromonas* (*A. dhakensis*, *A. hydrophila* and *A. jandaei*) isolated from freshwater crocodiles (*Crocodylus siamensis*) with pneumonia and septicemia. Lett Appl Microbiol. 2019;68(3):212–8. <https://doi.org/10.1111/lam.13112>.
61. Salighehzadeh R, Sharifiyazdi H, Akhlaghi M, Khalafian M, Gholamhosseini A, Soltanian S. Molecular and clinical evidence of *Aeromonas hydrophila* and *Fusarium solani* co-infection in narrow-clawed crayfish *Astacus leptodactylus*. Dis Aquat Org. 2019;132:135–41. <https://doi.org/10.3354/dao03309>.
62. Grilo ML, Sousa SC, Robalo J, Oliveira M. The potential of *Aeromonas* spp. from wildlife as antimicrobial resistance indicators in aquatic environments. Ecol Indic. 2020;115. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106396>.
63. Igbinosa IH, Igumbor EU, Aghdasi F, Tom M, Okoh AI. Emerging *Aeromonas* species infections and their significance in public health. Sci World J. 2012;625023. <https://doi.org/10.1100/2012/625023>.
64. Dodd CER. Infrequent Microbial Infections. Foodborne Dis. 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385007-2.00013-9>.
65. Djuikom E, Njiné T, Nola M, Kemka N, Togouet SZ, Jugnia LB. Significance and suitability of *Aeromonas hydrophila* vs. fecal coliforms in assessing microbiological water quality. World J Microbiol Biotechnol. 2008;24(11):2665–70. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9793-4>.
66. Igbinosa IH, Beshiru A, Odjadjare EE, Ateba CN, Igbinosa EO. Pathogenic potentials of *Aeromonas* species isolated from aquaculture and abattoir environments. Microb Pathog. 2017;107:185–92. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.037>.
67. Nwokocha ARC, Onyemelukwe NF. *Plesiomonas shigelloides* diarrhea in Enugu area of the southeastern Nigeria: incidence, clinical and epidemiological features. J Dent Sci. 2014;13:68–73.
68. Chen X, Chen Y, Yang Q, Kong H, Yu F, Han D, et al. *Plesiomonas shigelloides* infection in Southeast China. PLoS ONE. 2013;8:11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077877>.
69. Jacobs L, Chenia HY. Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African aquaculture systems. Int J Food Microbiol. 2007;114(3):295–306. <https://doi.org/10.1016/j.jifoodmicro.2006.09.030>.
70. Wu CJ, Ko WC, Lee NY, Su SL, Li CW, Li MC, et al. *Aeromonas* isolates from fish and patients in Tainan City, Taiwan: genotypic and phenotypic characteristics. Appl Environ Microbiol. 2019;85(21):e01360–19. <https://doi.org/10.1128/AEM.01360-19>.
71. Piotrowska M, Przygodzińska D, Matyjecz K, Popowska M. Occurrence and variety of β -lactamase genes among *Aeromonas* spp. isolated from urban wastewater treatment plant. Front Microbiol. 2017;8:863. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00863>.
72. Vega SV, Latif EF, Soriano VE, Beaz HR, Figueras MJ, Aguilera AMG, et al. Re-identification of *Aeromonas* isolates from rainbow trout and incidence of class 1 integron and β -lactamase genes. Vet Microbiol. 2014;172(3–4): 528–33. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.06.012>.
73. Sah SK, Hemalatha S. Extended spectrum Beta lactamase (ESBL) Mechanism of antibiotic resistance and Epidemiology. Int J Pharmtech Res. 2015;7(2):303–9.
74. Abgottsporn H, Nüesch-Inderbinnen MT, Zurfluh K, Althaus D, Hächler H, Stephan R. Enterobacteriaceae with extended-spectrum-and pAmpC-type β -lactamase-encoding genes isolated from freshwater fish from two lakes in Switzerland. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(4): 2482–4. <https://doi.org/10.1128/AAC.02689-13>.
75. Marathe NP, Gaikwad SS, Vaishampayan AA, Rasane MH, Shouche YS, Gade WN. Mossambicus tilapia (*Oreochromis mossambicus*) collected from water bodies impacted by urban waste carries extended-spectrum beta-lactamases and integron-bearing gut bacteria. J Biosci. 2016;41(3): 341–6. <https://doi.org/10.1007/s12038-016-9620-2>.
76. Ekundayo TC, Okoh AI. Antimicrobial resistance in freshwater *Plesiomonas shigelloides* isolates: Implications for environmental pollution and risk assessment. Environ Pollut. 2019;257. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113493>.
77. Wiegand I, Burak S. Effect of inoculum density on susceptibility of *Plesiomonas shigelloides* to cephalosporins. J Antimicrob Chemother. 2004;54(2):418–23. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh322>.
78. Stock I, Wiedemann B. Natural antimicrobial susceptibilities of *Plesiomonas shigelloides* strains. J Antimicrob Chemother. 2001;48(6): 803–11. <https://doi.org/10.1093/jac/48.6.803>.
79. Martins AFM, Pinheiro TL, Imperatori A, Freire SM, Sá-Freire L, Moreira BM, et al. *Plesiomonas shigelloides*: A notable carrier of acquired antimicrobial resistance in small aquaculture farms. Aquaculture. 2019;500:514–20. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.040>.
80. Aravena RM, Inglis TJJ, Henderson V, Riley TV, Chang BJ. Antimicrobial susceptibilities of *Aeromonas* strains isolated from clinical and environmental sources to 26 antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(2):1110–2. <https://doi.org/10.1128/AAC.05387-11>.
81. Kolda A, Mujakić I, Perić L, Smrzić IV, Kapetanović D. Microbiological Quality Assessment of Water and Fish from Karst Rivers of the Southeast Black Sea Basin (Croatia), and Antimicrobial Susceptibility of *Aeromonas* Isolates. Curr Microbiol. 2020;77:2322–32. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02081-5>.
82. Baron S, Granier SA, Larvor E, Jouy E, Cieux M, Wilhelm A, et al. *Aeromonas* diversity and antimicrobial susceptibility in freshwater – an attempt to set generic epidemiological cut-off values. Front Microbiol. 2017;8:503. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00503>.
83. Pazda M, Kumirska J, Stepnowski P, Mulkiewicz E. Antibiotic resistance genes identified in wastewater treatment plant systems—A review. Sci Total Environ. 2019;697:134023. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134023>.
84. Limbu SM. Antibiotics Use in African Aquaculture: Their Potential Risks on Fish and Human Health. In: Abia A, Lanza G, editors. Current Microbiological Research in Africa. Cham: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-35296-7_8.
85. Preena PG, Swaminathan TR, Kumar VJR, Singh ISB. Antimicrobial resistance in aquaculture: a crisis for concern. Biol. 2020;75:1497–517. <https://doi.org/10.2478/s11756-020-00456-4>.
86. Zdanowicz M, Mudryk ZJ, Perliński P. Abundance and antibiotic resistance of *Aeromonas* isolated from the water of three carp ponds. Vet Res Commun. 2020;44:9–18. <https://doi.org/10.1007/s11259-020-09768-x>.
87. Aguilar ZG, Ruiz LA, Betancourt LM. Presencia de compuestos organoclorados persistentes (COPS) en poblaciones de trucha dorada Mexicana (*Oncorhynchus chrysogaster*), especie endémica de la Sierra Madre Occidental. In: Ruiz LA, García-De León FJ, editors. La trucha dorada mexicana. México: CIAD-CIBNOR; 2016. p. 115–24.
88. Ruiz LA, García DLJF. Estado actual y perspectivas en la investigación de la trucha dorada mexicana, un recurso poco conocido. In: Ruiz LA, García De León FJ, editors. La trucha dorada mexicana. México: CIAD-CIBNOR; 2016. p. 1–11.
89. Martino ME, Fasolato L, Montemurro F, Rosteghin M, Manfrin A, Patarnello T, et al. Determination of microbial diversity of *Aeromonas* strains on the basis of multilocus sequence typing, genotype and presence of putative virulence genes. Appl Environ Microbiol. 2011;77: 4986–5000. <https://doi.org/10.1128/AEM.00708-11>.

90. Hanninen ML, Hirvela KV. Genetic diversity of atypical *Aeromonas salmonicida* studied by pulse field gel electrophoresis. *Epidemiol Infect.* 1999;123:299–307. <https://doi.org/10.1017/s0950268899002903>.
91. Levin RE. Rapid Detection and Characterization of Foodborne Pathogens by Molecular Techniques, 1st ed: CRC Press, Taylor and Francis Group; 2010. <https://doi.org/10.1201/9781420092431>.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



B) CAPÍTULO 2.

AISLAMIENTO DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS CONTRA *Aeromonas* spp. y *Plesiomonas shigelloides* PROCEDENTES DE GRANJAS TRUTÍCOLAS DE MICHOACÁN

RESUMEN

El tratamiento con antibióticos contra bacterias patógenas en piscicultura resulta ineficaz por la pérdida de apetito. En ese sentido, la fagoterapia puede ser una alternativa viable ya que se trata del uso de virus bacteriófagos, virus que lisan bacterias. En este estudio se obtuvo una colección de bacteriófagos para el biocontrol de cepas epidemiológicamente relevantes de *Aeromonas* spp. y *P. shigelloides* en granjas trutícolas de Michoacán. Se colectaron muestras de agua y sedimento de Lázaro Cárdenas y de una planta de tratamiento de aguas residuales en Morelia. Se utilizaron 10 cepas de *Aeromonas* spp. y una de *P. shigelloides*, de un estudio epidemiológico previo, como hospederos para el aislamiento de los bacteriófagos mediante el método de enriquecimiento. Se realizó la detección de los bacteriófagos mediante una versión modificada del método de agar de doble capa. Se obtuvieron un total de 56 bacteriófagos contra *Aeromonas* spp. y *P. shigelloides*, de estos, 5 bacteriófagos líticos son candidatos para el biocontrol de *Aeromonas* en la piscicultura.

ABSTRACT

Antibiotic treatment is ineffective due to loss of appetite in sickened fish. Phage therapy may be a viable alternative, which use viruses that lyse bacteria. The present study aimed to obtain a collection of bacteriophages for biocontrol of epidemiologically relevant strains of *Aeromonas* spp. and *P. shigelloides* from rainbow trout farms in Michoacán. Water and sediment samples were collected from Lázaro Cárdenas and a sewage treatment plant in Morelia. Ten strains of *Aeromonas* spp. and one of *P. shigelloides* from a previous epidemiological survey were used as hosts for bacteriophage isolation by enrichment method. Bacteriophages were detected using a modified version of the double-layer agar method. A total of 56 bacteriophages were obtained against *Aeromonas* spp. and *P. shigelloides*, of these five lytic bacteriophages are candidates for the biocontrol of *Aeromonas* in fish farming.

1. INTRODUCCIÓN

Una amenaza para la productividad de la acuicultura son las enfermedades infecciosas, las cuales, se estima que causan el 31% de pérdidas en acuicultura (Olmos *et al.*, 2015). Dentro de las enfermedades infecciosas de origen bacteriano, se identifican principalmente ocasionada por las bacterias Gram-negativas, entre ellas, especies del género *Aeromonas* que se consideran patógenos importantes para la acuicultura (FAO, 2016) y con presencia de multirresistencia a antimicrobianos (Jacobs y Chenia, 2007; Piotrowska *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2019; Fuentes *et al.*, 2022). Tal es el caso de *A. salmonicida*, el cual es un importante patógeno bacteriano en peces, en particular de los salmónidos, el cual ocasiona la forunculosis o “enfermedad de la fresa” (Menanteau-Ledouble *et al.*, 2016) y alcanza mortalidades de hasta 90% en las granjas infectadas (Kirkan *et al.*, 2003). Otra bacteria acuática que se asocia a la piscicultura comercial es *Plesiomonas shigelloides* (Janda *et al.*, 2016), la cual es responsable de brotes infecciosos con mortalidades altas (40-100%) en algunos salmónidos y en los cíclidos (Hu *et al.*, 2014, Nisha *et al.*, 2014; Behera *et al.*, 2018). Asimismo recientemente se reportó la coinfección bacteriana entre *Plesiomonas shigelloides* y dos especies de *Aeromonas* en la trucha dorada mexicana (*Oncorhynchus chrysogaster*) con categoría de riesgo amenazada, dicha coinfección bacteriana fue responsable de mortalidades del 90% (Fuentes *et al.*, 2022). También se reportan aislamientos de *Plesiomonas shigelloides* resistentes para una amplia variedad de β -lactámicos (Stock y Wiedemann, 2001; Ekundayo y Okoh, 2019). Retoma consideración especial en la salud humana que las *Aeromonas* spp. y *Plesiomonas shigelloides* se les considera como patógenos emergentes y están asociadas con infecciones intestinales y extraintestinales (Theodoropoulos *et al.*, 2001; Borella *et al.*, 2020). Actualmente se considera el desarrollo de la resistencia bacteriana como uno de los riesgos más graves para la salud pública. Aunado a lo anterior, existe escasez mundial de antibióticos innovadores, por lo que la OMS señala recientemente que ninguno de los 43 antibióticos en fase de desarrollo clínico resuelve suficientemente el problema de la farmacorresistencia de las bacterias más peligrosas del mundo (OMS, 2021). En

particular el ambiente acuático se considera como una de las principales rutas de diseminación de genes de resistencia a los antibióticos, debido a la contaminación derivada de las actividades antropogénicas. Se considera que el uso de antibióticos en la crianza de animales representa aproximadamente el 50% del uso total de estos y corresponde al sector que más utiliza antibióticos en comparación a los que se prescriben en los humanos (Jian *et al.*, 2021). La acuicultura requiere de sistemas de cultivo intensivos y un volumen de antibióticos proporcionalmente mayor al que se aplica en las explotaciones de animales terrestres. Sin embargo, se calcula que alrededor del 80% de los alimentos medicados con antibióticos no se consumen por los organismos acuáticos enfermos, por lo que dichos antibióticos se liberan al entorno acuático con su actividad intacta (Cabello *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2021). Además el uso indiscriminado de los agentes antimicrobianos selecciona a patógenos resistentes de peces, lo que incrementa la dificultad para el control de las infecciones bacterianas (Sorum, 2006). Actualmente existen numerosos reportes de bacterias resistentes a los antibióticos en el ambiente acuático (Devarajan *et al.*, 2017; Pérez *et al.*, 2020). Por lo anterior, estrategias de biocontrol como los bacteriófagos para combatir la infecciones ocasionadas por patógenos bacterianos emergentes como son las *Aeromonas spp.* y *Plesiomonas shigelloides* son de interés para sustituir a la brevedad el uso de los antibióticos en la piscicultura.

1.1 Características generales de los Bacteriófagos y ciclos replicativos.

Los bacteriófagos son las entidades biológicas más abundantes en la Tierra superan aproximadamente 10 veces el número de las bacterias (Brüssow y Hendrix, 2002). Los bacteriófagos son virus predadores naturales de bacterias, miden entre 50 y 200 nm (Richter *et al.*, 2018). Los bacteriófagos fueron descubiertos antes que los antibióticos, de manera independiente por Frederick Twort en 1915 y Félix d'Hérelle en 1917 (Salmond y Fineran, 2015). Su descubrimiento se considera uno de los más importantes en la historia moderna de la investigación biomédica, ya que fueron considerados como una herramienta muy prometedora contra las infecciones bacterianas. Félix d'Hérelle, en 1919, fue el primer científico en administrar los

bacteriófagos por vía oral a niños con diarrea ocasionada por una infección con *Shigella dysenteriae*. Los niños se recuperaron en 24 horas (Sulakvelidze y Kutter, 2005). No obstante, con el descubrimiento de la penicilina, por Sir Alexander Fleming en 1928 como el primer antibiótico, y su posterior introducción en la industria médica en 1940, marcó el inicio de la era de los antibióticos por lo que los bacteriófagos quedaron relegados a un segundo plano. Los bacteriófagos son abundantes en el medio acuático, suelo, plantas y en los animales. En los humanos, los fagos se pueden encontrar en la piel, la boca, el estómago y el intestino, donde se reportan hasta 100 millones de partículas virales por ml de filtrados fecales (Hoyles *et al.*, 2014).

Los bacteriófagos son parásitos obligados intracelulares de las bacterias y con base a sus ciclos replicativos se clasifican en líticos y lisogénicos (Salmond y Fineran, 2015), en particular los bacteriófagos líticos se consideran idóneos ya que causan la muerte bacteriana, por lo que son una alternativa de biocontrol (Melo *et al.*, 2020) al empleo de los antibióticos. Entre las ventajas que presentan están: son ubicuos en el medio ambiente, diversos, económicos, inofensivos para las especies animales y específicos para las cepas bacterianas. El ciclo lítico consta de cinco etapas, inicia con el reconocimiento del bacteriófago para lo cual la cola se adhiere a un receptor específico de la superficie bacteriana. Estos receptores pueden situarse en las paredes celulares, en los polisacáridos capsulares, en las proteínas de la membrana externa, bombas de eflujo o en los apéndices, como los pili y los flagelos. La relación de bloqueo entre un bacteriófago y los receptores bacterianos suele determinar el rango de huéspedes que el virus es capaz de infectar, y la lista de receptores de los bacteriófagos caracterizados crece constantemente (Gordillo y Barr 2019). En segundo lugar, ocurre la inyección del material genético en la bacteria huésped a través del tubo de cola que penetra a través de la membrana celular. En tercer lugar, los bacteriófagos realizan la biosíntesis de los componentes virales, posteriormente ocurre el ensamblaje de la progenie viral nueva (Salmond y Fineran, 2015). Por último, cuando el número de los bacteriófagos alcanza un determinado umbral (Olszak *et al.*, 2017), se lleva su liberación de la célula infectada en un lapso de

minutos u horas (Guttman *et al.*, 2005) mediante un complejo de lisis conformado por las endolisinas y las holinas (Fig. 1) (Fuentes *et al.*, 2021). Esta progenie viral es capaz de infectar a hospederos nuevos y repetir el ciclo lítico (Batinovic *et al.*, 2019). Las endolisinas son enzimas con potente actividad antibacteriana en el tratamiento de infecciones bacterianas multirresistentes (Schmelcher *et al.*, 2012). Debido a su naturaleza proteica, en comparación a los bacteriófagos, se considera el uso de las endolisinas más seguro al ser libres de material genético (Gondil *et al.*, 2020). No obstante, existe poca información sobre este tema en la acuicultura.

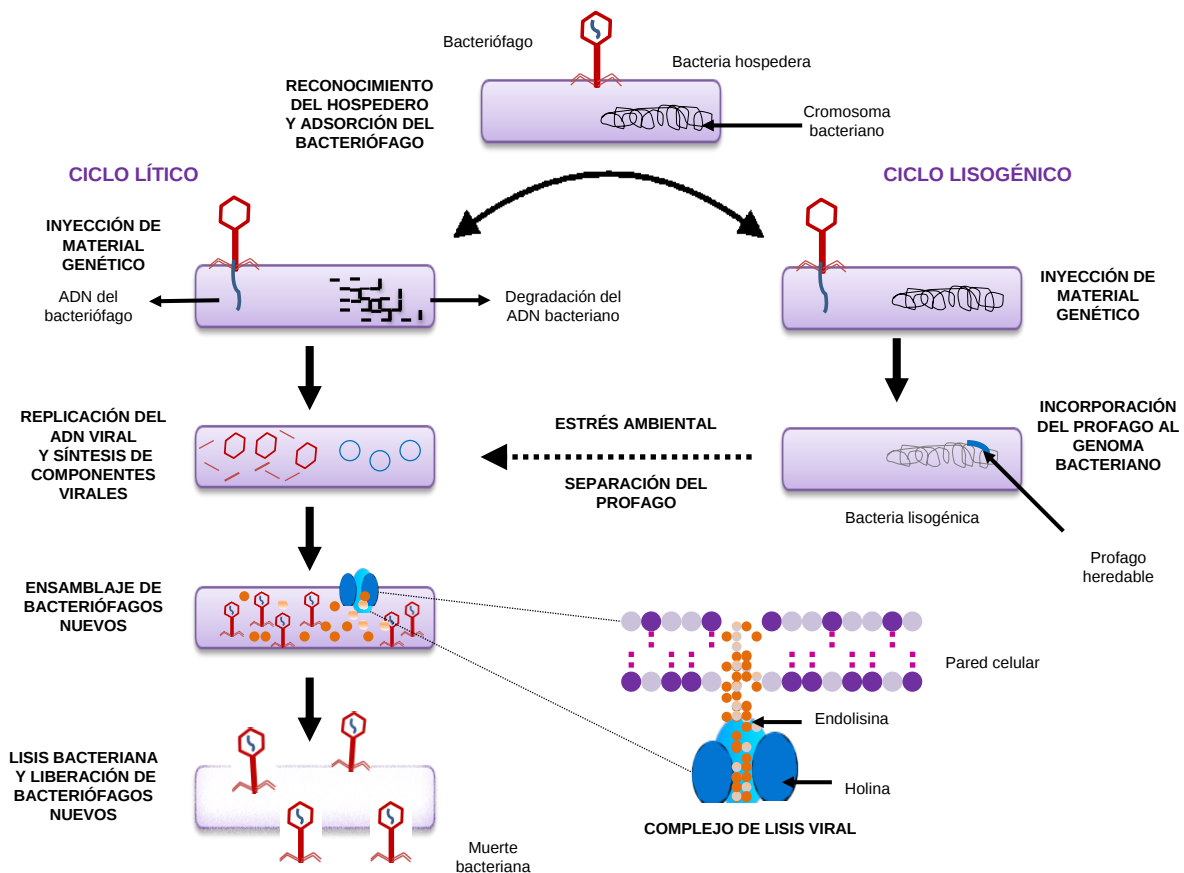


Figura 1. Complejo de lisis de los bacteriófagos líticos (Tomado de Fuentes *et al.*, 2021).

En el ciclo lisogénico los bacteriófagos temperados o lisogénicos pueden entrar en el ciclo lítico o formar una asociación estable con el hospedador, denominada lisogenia. Durante la lisogenia, el genoma viral se denomina profago y se replica integrado al ADN del hospedador, ya sea en un estado libre, similar al de un plásmido o integrarse en el cromosoma bacteriano. Los bacteriófagos lisogénicos pueden pasar de la lisogenia al ciclo lítico de forma espontánea (Mantynen *et al.*, 2021) o en condiciones de estrés ambiental como la desecación, exposición a químicos mutagénicos, a la luz UV o a la radiación ionizante (Rohde *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2020), los profagos pueden salir del estado lisogénico y producir más viriones que se liberan de la bacteria (Fig 1). Normalmente, la liberación de la progenie de fagos provoca la muerte bacteriana por lisis celular (Salmond y Fineran, 2015). Una excepción ocurre con los bacteriófagos filamentosos los cuales se liberan por secreción a través de la membrana externa bacteriana, por lo que se evita la muerte de la bacteria pero se produce una infección crónica que disminuye el crecimiento de la bacteria hospedadora (Rakonjac *et al.*, 2011). Los bacteriófagos lisogénicos generalmente no se recomiendan con propósitos terapéuticos debido a su capacidad de transferir genes entre bacterias por transducción especializada, un evento que puede aumentar la virulencia bacteriana, por ejemplo, promover la resistencia antimicrobiana, codificar para toxinas (Monteiro *et al.*, 2018; Gordillo y Barr, 2019; Melo *et al.*, 2020;), lo cual representa una amenaza para la producción de alimentos de origen acuático y para la inocuidad alimentaria (Rao y Lalitha, 2015). No obstante, los avances en las tecnologías de secuenciación y la biología sintética ofrecen oportunidades nuevas para explorar el uso de los bacteriófagos lisogénicos con la ingeniería de variantes estrictamente líticos (incapaces de establecer el estado lisogénico) para la terapia contra las infecciones bacterianas. Este tipo de bacteriófagos también poseen características importantes ya que son muy abundantes en los genomas bacterianos, por lo que son fáciles de encontrar y aislar (Monteiro *et al.*, 2018).

En los dos tipos de bacteriófagos líticos y lisogénicos se presenta la pseudolisogenia en la cual el genoma fágico no se integra o propaga, dicho estado se reporta en condiciones limitantes de nutrientes de la bacteria. Después de entrar en la célula

huésped, el material genético del bacteriófago permanece inactivo en forma de episoma circular, por lo que la bacteria es sólo un vector del bacteriófago (Olszak *et al.*, 2017).

1.2 Fagoterapia, ventajas y desventajas.

La fagoterapia es el uso de virus bacteriófagos (fagos), que infectan y lisan a bacterias específicas para el control de las enfermedades infecciosas (Fuentes *et al.*, 2021). Por lo que la fagoterapia se considera como una alternativa viable para el tratamiento de infecciones bacterianas en animales en general (Barrera *et al.*, 2015) y en la acuicultura (Rao y Lalitha, 2015). Los bacteriófagos son ubicuos en el medio ambiente por lo que pueden aislarse del agua, las aguas residuales, el suelo, las granjas, los alimentos. Presentan alta especificidad al huésped y son inofensivos para animales (Carvalho *et al.*, 2017; Rehman, 2019). Los bacteriófagos permanecen en un ambiente sólo cuando sus hospederos están presentes, cuando todos sus hospederos son lisados, los fagos se eliminan automáticamente (Loc y Abedon, 2011). Otras ventajas de la fagoterapia: causa menos efectos nocivos en la microbiota comensal en comparación con los antibióticos debido a su alta especificidad; su alta capacidad de autoréplicarse y autolimitarse; su gran especificidad, su fácil aislamiento; el bajo costo y la rapidez de su producción (Loc y Abedon, 2011; Parasion *et al.*, 2014), entre otras (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación entre la terapia antibiótica y la terapia bacteriofágica.

CARACTERÍSTICA	TERAPIA ANTIBIÓTICA	TERAPIA BACTERIOFÁGICA	REFERENCIAS
Especificidad bacteriana	No específica.	Altamente específica para su bacteria hospedera: mínima disrupción de la microbiota normal.	Debarbieux <i>et al.</i> , 2010; Loc y Abedon, 2011; Khan <i>et al.</i> , 2022
Impacto ambiental	Alto, su liberación ambiental puede llevar a la	Bajo, los fagos no se adaptan a factores	Loc y Abedon, 2011; Khan <i>et al.</i> , 2022

	contaminación de cuerpos de agua y el desarrollo de resistencia a los antibióticos.	ambientales degradadores (luz solar, la desecación o las temperaturas extremas).	
Modo de acción	Acción inhibitoria sobre el ADN, el ARN y la síntesis de la pared celular.	Lisis celular.	Khan <i>et al.</i> , 2022
Aislamiento	Difícil	Fácil debido a que son ubicuos, constituyen un recurso inagotable.	Loc y Abedon, 2011; Rehman, 2019; Huang <i>et al.</i> , 2022.
Autolimitación	Ausente	Presente	Loc y Abedon, 2011; Gordillo y Barr, 2019.
Autodosificación	Ausente	Presente “terapia activa”	Loc y Abedon, 2011; Rehman <i>et al.</i> , 2019
Dosis requerida	Alta	Baja	Loc y Abedon, 2011.
Adaptación a especies bacterianas resistentes	Ausente	Presente, los fagos evolucionan en respuesta a la evolución de sus bacterias hospederas.	Debarbieux <i>et al.</i> , 2010; Harper <i>et al.</i> , 2021.
Efectividad sobre biopelículas bacterianas	Ausente	Presente	Loc y Abedon, 2011.
Costos de producción	Altos	Bajos	Loc y Abedon, 2011.
Disponible para pacientes alérgicos a los antibióticos	Ausente	Presente	Gordillo y Barr, 2019.

No obstante, como algunos antibióticos, los bacteriófagos pueden causar rápida lisis masiva bacteriana y liberación de componentes celulares de la pared (por ejemplo lipopolisacáridos), lo cual puede provocar un efecto adverso en las respuestas inmunes en el humano (Gorski *et al.*, 2012), al igual que sucede con los antibióticos.

Tanto la terapia bacteriofágica como la antibiótica son afectadas por la resistencia bacteriana (Gordillo y Barr, 2019). Como se mencionó anteriormente los bacteriófagos están presentes en todos los ambientes microbianos y la importancia de la depredación de los bacteriófagos sobre las bacterias queda evidente en la amplia variedad de los mecanismos de defensa antifágica de las bacterias (Sausset *et al.*, 2020). Actualmente se considera en auge el descubrimiento de los sistemas de defensa contra los bacteriófagos (Egido *et al.*, 2022). En estudios previos se reporta la resistencia a los bacteriófagos *in vitro* en un corto lapso de tiempo en horas posteriores al tratamiento con los bacteriófagos. Tal fue el caso de *Pseudomonas aeruginosa* en la que una eliminación de una región de ADN cromosómico ocasionó un fenotipo resistente (Le *et al.*, 2014). Sin embargo, los bacteriófagos presentan plasticidad genómica y replicación rápida por lo que pueden contrarrestar los sistemas antivirales de las bacterias (Samson *et al.*, 2013) debido a la acumulación de mutaciones que terminan evadiendo los mecanismos de defensa antivirales. Tanto bacterias como bacteriófagos co-evolucionan con el huésped y fácilmente se pueden obtener nuevos aislamientos de bacteriófagos para los que la cepa bacteriana sea susceptible. Una mezcla de múltiples bacteriófagos líticos conocida como cóctel de bacteriófagos (Rohde *et al.*, 2018) y otros antimicrobianos permiten evadir la capacidad de resistencia a los bacteriófagos (Rao y Lalitha, 2015).

Entre otros mecanismos de defensa antifágica de las bacterias se incluyen la inhibición de la adsorción fágica mediante las modificaciones de la superficie celular que impiden el reconocimiento de los bacteriófagos, ya que la multiplicación de éstos depende en gran medida de la selección adecuada de sus bacterias objetivo (Sausset *et al.*, 2020). Tales mecanismos de inhibición de la adsorción pueden dividirse en al menos tres categorías: el bloqueo de los receptores del fago, la producción de matriz extracelular o de inhibidores competitivos (Labrie *et al.*, 2010). Sin embargo, dichas modificaciones pueden representar una desventaja para la bacteria hospedera, en términos de la reducción de su virulencia y de la capacidad de la supervivencia a las presiones ambientales, lo cual se podría aprovechar en la terapia fágica para generar sinergia con la terapia antibiótica o con las defensas inmunitarias innatas del huésped para ayudar a eliminar las infecciones bacterianas

(Mangalea y Duerkop, 2020). Otro sistema de defensa de la bacteria hospedera es la infección abortiva, la cual desencadena la muerte bacteriana antes de que los bacteriófagos completen su ciclo de replicación con el fin de proteger al resto de la población de bacterias (Sausset *et al.*, 2020; Egido *et al.*, 2022;). En estudios previos se reportan los sistemas de defensa innato e inmune adquiridos en las bacterias contra las infecciones de los bacteriófagos. Entre los innatos se encuentran los sistemas de restricción/modificación (R-M), que actúan sobre cualquier DNA exógeno que ingrese en la célula, a través del reconocimiento estructural en las secuencias específicas de bases del ADN invasor y se considera que la mayoría de las bacterias presentan este tipo de sistema (Dimitriu *et al.*, 2020; Egido *et al.*, 2022). Mediante un análisis genómico de las bacterias y Archaea, se identificaron sistemas de defensa nuevos asociados a la restricción/modificación que amplían el arsenal defensivo que disponen los procariotas contra sus virus, como son las islas de defensa DISARM (defence island system associated with restriction–modification). Dichas islas están conformadas por cinco genes que codifican para una DNA metilasa y proteínas como la helicasa, fosfolipasa y DUF1998; así como un gen con función desconocida, no obstante su mecanismo de acción exacto aún no se caracteriza (Ofir *et al.*, 2018).

Actualmente el único sistema inmunitario adquirido y hereditario contra los bacteriófagos que se conoce en los procariotas es el sistema CRISPR-Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR) (Somerville *et al.*, 2022; Watson *et al.*, 2021). Estos sistemas se reportan en el 40% y en el 90% de los genomas bacterianos y Archaea, respectivamente (Makarova *et al.*, 2020). Brevemente, en el sistema CRISPR-Cas ocurren las siguientes etapas: durante la exposición inicial, conocida como adaptación, se puede grabar una "memoria" de la infección en el ADN de la bacteria hospedera mediante la incorporación de las secuencias cortas de ADN de los bacteriófagos u otros elementos genéticos (denominados espaciadores) en matrices CRISPR específicas que se codifican en el genoma bacteriano. Al encontrarse con un bacteriófago, los espaciadores transcritos se unen al ADN viral y lo dirigen para su degradación a través de las proteínas Cas (Koonin y Makarova 2019; Dimitriu *et al.*, 2020; Watson *et al.*, 2021). No obstante, los bacteriófagos co-evolucionan para escapar del sistema CRISPR-Cas a través de

mutaciones en los espaciadores o incluso por la síntesis de proteínas anti-CRISPR (Acr) que interfieren con el sistema (Azam y Tanji, 2019). Los sistemas CRISPR-Cas son altamente diversos por lo que se considera que estamos en el inicio de comprender su importancia en la defensa de las bacterias contra los bacteriófagos (Watson *et al.*, 2021).

1.3 Uso de la fagoterapia en la piscicultura

1.3.1 Antecedentes de la fagoterapia en la piscicultura

El uso indiscriminado de los antibióticos en la producción animal es una de las principales causas de la diseminación rápida de la resistencia antimicrobiana (Huang *et al.*, 2022), los cuales globalmente se usan como promotores de crecimiento o como profilácticos para aumentar la productividad (Hao *et al.*, 2014; Aslam *et al.*, 2022). En algunos países como la Unión Europea esta práctica se prohibió desde el 2003 (Comisión Europea ,2003).

Actualmente en la acuicultura solo tres antibióticos están aprobados para su uso terapéutico: Florfenicol, Oxitetraciclina, Sulfadimetoxina/ormetoprima y la Sulfamerazina (FDA, 2022). No obstante, se presentan implicaciones importantes en el uso de antibióticos en la piscicultura debido a la vía de aplicación, la cual es a través del alimento. Los peces enfermos no obtienen los niveles óptimos del tratamiento en sus tejidos a causa de la pérdida de apetito, mientras que los peces sanos alcanzan niveles altos de los antibióticos (Björklund *et al.*, 1990; Sorum 2006). En adición, el ambiente que rodea a los peces como el agua, sedimentos y otros sistemas biológicos son expuestos directamente a los antibióticos debido a que estos se disuelven en el agua (Kümmerer, 2009).

Los bacteriófagos y sus derivados se consideran soluciones antimicrobianas alternativas al uso de antibióticos (Carvalho *et al.*, 2017). En particular, los bacteriófagos líticos tienen el potencial para el control específico de bacterias patógenas sin un impacto negativo al ambiente en comparación a los antibióticos, por lo que se reconocen como agentes bioterapéuticos (Mahony *et al.*, 2011). Varios estudios demuestran la utilidad de los bacteriófagos líticos en el control de diferentes

tipos de bacterias patógenas de peces y organismos marinos. La mayoría de los fagos que se han empleado pertenecen a las familias virales *Siphoviridae*, *Myxoviridae* y *Podoviridae* (Rao *et al.*, 2015). Asimismo, se reportan bacteriófagos depredadores de vibrios como *V. anguillarum*, *V. harveyi*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* (Pelon *et al.*, 2005; Crothers *et al.*, 2010; Higuera *et al.*, 2013; Lomelí y Martínez, 2014; Wang *et al.*, 2016; Jun *et al.*, 2016).

1.3.2 Fagoterapia para el control de infecciones por *Aeromonas* spp. en peces.

Ackerman *et al.* (2007) reportaron un total de 43 fagos contra las *Aeromonas* spp. caracterizados mediante microscopía electrónica, los cuales se clasifican como fagos con cola y pertenecen a tres familias de virus: *Myoviridae* (33), *Siphoviridae* (7) y *Podoviridae* (3) (Ackermann, 2007). Sin embargo, son pocos los bacteriófagos con evaluaciones *in vivo* para el biocontrol de infecciones de *Aeromonas* en los peces. Dichos bacteriófagos se aislaron principalmente del agua, para el control de dos especies de *Aeromonas*: *A. hydrophila* y *A. salmonicida* (Tabla 2).

Diversas investigaciones en peces reportan la efectividad de la fagoterapia en el control de *A. hydrophila*. En organismos de *Misgurnus anguillicaudatus* se administraron dos diferentes bacteriófagos (pAh1-c y pAh6-c), ambos fagos proporcionaron efectos protectores, ya que incrementaron la tasa de sobrevivencia de los peces contra la infección de *A. hydrophila*. En un primer experimento no se registró mortalidad en los grupos de peces tratados con ambos fagos y en un segundo experimento las mortalidades acumuladas fueron de $43.33 \pm 2.89\%$ con el fago (pAh1-C) y de $16.67 \pm 3.82\%$ con el fago pAh6-C. Concluyen que para el éxito de la fagoterapia una combinación de ambos fagos puede incrementar la efectividad (Jun *et al.*, 2013).

En desafíos de peces zebra (*Danio rerio*) con *A. hydrophila* se identificó una mortalidad acumulada a las 48 post-infección de $96.67 \pm 5.77\%$, dicha mortalidad fue menor ($56.67 \pm 35.11\%$) cuando se administró el fago pAh-1. La tasa de supervivencia de los peces se incrementó un 43% (Easwaran *et al.*, 2017).

Asimismo, se reportan evaluaciones de la fagoterapia para controlar infecciones ocasionadas por *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* en la trucha arco iris. En el

grupo control (ausencia del bacteriófago) murieron el 100% de truchas a los dos días, mientras que con la aplicación de los bacteriófagos se incrementó la sobrevivencia $26.7 \pm 2.9\%$ y el promedio de tiempo de muerte 3.3 ± 0.6 días. Además se observaron efectos protectores significativos con la administración de la fagoterapia, ya que los peces sobrevivientes no mostraron lesiones ulcerosas en el lugar de la inyección bacteriana (Kim *et al.*, 2013).

Tabla 2.- Fagoterapia para el control de infecciones por *Aeromonas* spp. en peces

<i>Aeromonas hydrophila</i>					
Fago	Fuente de aislamiento	Administración	Resultados	Especie	Referencia
pAh1-c pAh6-c	Río	Inyección intraperitoneal/vía oral en alimento	Mejoras en la supervivencia	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	Jun <i>et al.</i> , 2013
UP87	Aguas residuales	Inyección intraperitoneal	Reducción de la cantidad de bacterias en la sangre	<i>Oreochromis niloticus</i>	Cruz <i>et al.</i> , 2014
pAh-1	Agua	Inyección intraperitoneal	Supervivencia se incrementó un 43%	<i>Danio rerio</i>	Easwaran <i>et al.</i> , 2017
<i>Aeromonas salmonicida</i>					
HER 110	Río	Agua	Redujo la mortalidad al 10%. Combinaciones de fagos pueden ser exitosamente usados en programas preventivos en las granjas.	<i>Salvelinus fontinalis</i>	Imbeault <i>et al.</i> , 2006

O, R, y B	Embalses	Alimento, baño, inyección intraperitoneal	Tratamiento no efectivo.	<i>Salmo salar</i>	Verner <i>et al.</i> , 2007
PAS-1	Sedimento de granja trutícola	Inyección intramuscular	Incremento en la sobrevivencia $26.7 \pm 2.9\%$ y promedio de tiempo de muerte 3.3 ± 0.6 días, en el grupo control (sin fago) murieron el 100% de las truchas a los 2 días.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Kim <i>et al.</i> , 2013
AS-A	Agua residuales	Agua	Ausencia de mortalidad, en el grupo control (sin fago) mortalidad del 36%	<i>Solea senegalensis</i>	Silva <i>et al.</i> , 2016

Los cócteles de fagos son una mezcla de múltiples fagos que infectan a la misma bacteria huésped y se pueden emplear para reducir la probabilidad del desarrollo de resistencia de la bacteria a un fago y para compensar los rangos de hospederos limitados que pudieran tener los bacteriófagos individuales. Así, los cócteles de fagos amplían el rango hospedero, por lo cual son más efectivos contra una cepa o múltiples cepas blanco (Doss *et al.*, 2017).

1.3.3 Fagoterapia para el control de infecciones por *Plesiomonas shigelloides* en peces.

Plesiomonas shigelloides es otra bacteria Gram negativa patógena para los peces dulceacuícolas asociadas con mortalidades altas del 60-90% (Behera *et al.*, 2018; Fuentes *et al.*, 2022), por lo que se investiga el uso de los bacteriófagos como una alternativa al empleo de los antibióticos. Por ejemplo, en el análisis de la comunidad de los bacteriófagos presentes en el contenido gastrointestinal del pez dulceacuícola

Ephippus orbis, procedente de cultivo en China se reportan por primera vez dos bacteriófagos líticos para *Plesiomonas shigelloides* (He y Yang, 2015). Recientemente se reporta otro bacteriófago lítico del contenido intestinal de *Ctenopharyngodon idella* perteneciente a la familia *Siphoviridae*, asimismo, en dicha investigación se evaluó *in vivo* su efecto protector mediante una inyección intraperitoneal en carpas herbívoras que presentaron infección por *P. shigelloides* y encontraron un aumento en la tasa de supervivencia del 33% (Zhang *et al.*, 2021).

1.4 Potencial de las enzimas líticas de los bacteriófagos.

En adición de los cócteles de fagos, las proteínas producidas y aisladas de los bacteriófagos se investigan como una alternativa (Doss *et al.*, 2017). Los bacteriófagos producen holinas (proteínas formadoras de poro) que permiten la salida de las endolisinas, enzimas que degradan la pared celular bacteriana (Gondil *et al.*, 2020). Las endolisinas se consideran enzibióticos (enzimas con actividad antibiótica) con potencial para el tratamiento de infecciones bacterianas multirresistentes, ya que son de naturaleza proteica, las endolisinas se consideran aún más seguras que los bacteriófagos por ser libres de material genético (Gondil *et al.*, 2020). Hasta el momento no se identifica desarrollo de resistencia bacteriana a éstas, debido a que las moléculas que degrada tienen estructuras que prácticamente no cambian. Las endolisinas tienen un espectro de acción más amplio que los bacteriófagos, lo cual las hace más atractivas como fármacos. Existen investigaciones sobre la actividad antimicrobiana de los enzibióticos con diversas aplicaciones (Tabla 3), sin embargo no existen trabajos sobre el uso de endolisinas para el tratamiento de infecciones bacterianas en la acuicultura. Además no existen fármacos comerciales que se basen en las endolisinas.

Tabla 3. Ejemplos de aplicaciones de los enzibióticos (Tomado de Fuentes *et al.*, 2021).

USO	ORGANISMO/ PRODUCTO ALIMENTICIO	ENDOLISINA	PATÓGENO	APLICACIÓN	CITA
Medicina humana y veterinaria	Células pulmonares humanas y ratones	LysSS (endolisina de bacteriófago vs <i>Salmonella enterica</i>)	<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , Enterobacterias	<i>In vitro</i> resultó ser un biocontrol efectivo para bacterias Gram negativas y positivas. Ausencia de efectos citotóxicos en las células humanas. Inyección intraperitoneal protegió a ratones con infección por <i>A. baumannii</i>	Kim <i>et al.</i> , 2020.
Agricultura	Planta de papa	Lisozima del Bacteriófago T4	<i>Erwinia carotovora</i>	Tecnología genética, las plantas con el gen de la lisozima fueron resistentes a la infección bacteriana.	Düring <i>et al.</i> , 1993.
Medicina veterinaria	Mamíferos	SAL200	<i>S. aureus</i>	Inyección intravenosa en distintos modelos animales. Reducción de bacterias en la sangre. Incrementó significativamente la sobrevivencia de los animales.	Jun <i>et al.</i> , 2013; 2016.
Inocuidad alimentaria	Leche de soya	LysZ5	<i>Listeria monocytogenes</i>	Directa en leche contaminada, reducción de la bacteria (3 hrs, 4°C).	Zhang <i>et al.</i> , 2012.

Las endolisinas son útiles para el control de las biopelículas (Love *et al.*, 2018). También se emplean para la desinfección de equipo hospitalario, así como en la elaboración y empaque de alimentos (Barrera *et al.*, 2015). Dichas proteínas tienen un potencial importante en la industria alimentaria, como aditivos antimicrobianos o bien como productos de secreción por las bacterias ácido lácticas en procesos de

fermentación. Además las endolisinas tienen potencial de aplicación para el control de infecciones bacterianas en diversos sectores productivos, tal como el agropecuario y el acuícola; así lo demuestran investigaciones recientes (Zduńczyk y Janowski, 2020; Zermeño *et al.*, 2018).

La partícula viral también posee actividad enzimática de glicosil-hidrolasa que puede ser usada para la lisis bacteriana (Barrera *et al.*, 2015; Valdez-Alarcón, 2017). Estas glicosil-hidrolasas, asociadas a la partícula viral (GHPV), permiten la inyección del ácido nucleico viral en la bacteria hospedera. A la fecha no existen reportes del uso de endolisinas y/o GHPVs en la acuicultura. Actualmente en los genomas de nueve fagos infectivos de *Aeromonas salmonicida* y *Aeromonas hydrophila*, se identificaron 10 genes que codifican para enzimas líticas, 8 y 2 genes respectivamente. En particular, el fago phiAS7 emplea un sistema dual de lisis durante su ciclo lítico y es el único fago perteneciente a la familia *Podoviridae*. En el genoma de la mayoría de los fagos estudiados no se presentan genes asociados a virulencia (Tabla 4).

Tabla 4. Genes de enzimas líticas identificadas en fagos de *Aeromonas* spp.

FAGO	FAMILIA	TAMAÑO (bp)	GENES DE ENZIMAS LÍTICAS	GENES DE VIRULENCIA	REFERENCIA
<i>Aeromonas salmonicida</i>					
phiAS7	<i>Podoviridae</i>	41,572	Gen F401_gp25: endolisina putativa Genes orf25 y orf29 (lisozima putativa). Probablemente este fago emplea un sistema dual de lisis durante su ciclo lítico.	Ausencia	Kim <i>et al.</i> , 2012; NCBI, 2017 Vincent <i>et al.</i> , 2017.
25	<i>Myoviridae</i>	161,475	Gen e (endolisina)	Ausencia	NCBI, 2017; Vincent <i>et al.</i> , 2017.
phiAS5	<i>Myoviridae</i>	225 268	Gen phiAS5_ORF0333: lisozima de la cola (GHPV).	Ausencia	Kim <i>et al.</i> , 2013 NCBI, 2017; Vincent <i>et al.</i> ,

			Gen phiAS5_ORF0117: lisozima mureína hidrolasa		2017.
PX29	<i>Myoviridae</i>	222,006	Gen t: lisozima mureína hidrolasa Gen 5 : subunidad del cubo de la placa base gp5 y lisozima de la cola	Ausencia	NCBI, 2017 Vincent <i>et al.</i> , 2017
65	<i>Myoviridae</i>	235,000	Gen 5: lisozima de la cola (GHPV)	Ausencia	Petrov <i>et al.</i> , 2006; Vincent <i>et al.</i> , 2017
31	<i>Myoviridae</i>	172,963	Gen 5 : Subunida (GHPV)d de la base de la placa y lisozima de la cola	Ausencia	Petrov <i>et al.</i> , 2006; Vincent <i>et al.</i> , 2017
44RR2.8t	<i>Myoviridae</i>		Gen 5 : subunidad del cubo de la base de la placa y lisozima de la cola GHPV	Ausencia	NCBI, 2017; Vincent <i>et al.</i> , 2017
<i>Aeromonas hydrophila</i>					
Aeh1	<i>Myoviridae</i>	233,234	Gen e: Lisozima intracelular Gen 5: Lisozima de la cola para la penetración durante la infección y la lisis desde afuera (GHPV)	DN	Petrov <i>et al.</i> , 2010 NCBI, 2017
CC2	<i>Myoviridae</i>	231,743	Gen F485_gp326: subunidad del cubo de la base de la placa (GPVH)	DN	Shen <i>et al.</i> , 2012

2. JUSTIFICACIÓN

El sector acuícola requiere el desarrollo de alternativas al uso de antibióticos para el biocontrol de cepas prevalentes de *Aeromonas* spp. en granjas trutícolas de Michoacán. Por lo que el uso de bacteriófagos y sus enzibióticos derivados constituyen una estrategia prometedora para el control de *Aeromonas* spp.

3. HIPÓTESIS

Los bacteriófagos aislados a partir del medio acuático son útiles para el biocontrol de cepas epidemiológicamente relevantes de *Aeromonas* spp. y *Plesiomonas shigelloides* en granjas trutícolas de Michoacán.

4. OBJETIVO GENERAL

Obtener una colección de bacteriófagos líticos para el biocontrol de cepas epidemiológicamente relevantes de *Aeromonas* spp. y *Plesiomonas shigelloides* en granjas trutícolas de Michoacán.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar y caracterizar los bacteriófagos a partir de muestras de agua y sedimentos.
- Evaluar la efectividad *in vitro* de los bacteriófagos en cepas epidemiológicamente relevantes de *Aeromonas* spp. y *Plesiomonas shigelloides*

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Bacterias hospederas para el aislamientos de los bacteriófagos.

Se emplearon 11 bacterias patógenas de peces como hospederas para el producir las suspensiones de los bacteriófagos (Tabla 5). Dichas bacterias previamente se obtuvieron de un estudio epidemiológico contemplado en este trabajo de investigación en las granjas trutícolas Michoacanas. Las cepas se les consideró epidemiológicamente relevantes debido a la prevalencia que se detectó en los órganos internos. Particularmente, las cepas RSDI- P6, Q6 y R6 fueron responsables de un brote infeccioso con mortalidades del 91% en la trucha dorada.

Tabla 5. Bacterias procedentes de granjas trutícolas de Michoacán utilizadas para el aislamiento de los bacteriófagos.

Cepa	Especie bacteriana	Órgano de aislamiento	Fuente de aislamiento
RSDI-A3	<i>Aeromonas sobria</i>	Riñón	Trucha arco iris <i>O. mykiss</i>
RSDI-L3	<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	Bazo	
RSDI-N1	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	Bazo	
RSDI-30	<i>Aeromonas rivipollensis</i>	Hígado	
RSDI-E5	<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	Riñón	
RSDI-O6	<i>Aeromonas sobria</i>	Riñón	
RSDI-85	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Riñón	

RSDI-M2	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Bazo	
RSDI-P6	<i>Aeromonas bestiarum</i> *	Bazo	Trucha dorada <i>O. chrysogaster</i>
RSDI-Q6	<i>Plesiomonas shigelloides</i> *	Bazo	
RSDI-R6	<i>Aeromonas sobria</i> *	Riñón	

*Bacterias responsables de mortalidades altas.

5.2 Sitios de muestreo para el aislamiento de los bacteriófagos.

Se colectaron muestras de agua (1L) del Río Balsas, Playa Azul, Estero Barra de Pichi en Lázaro Cárdenas y de la planta de tratamiento de aguas residuales del fraccionamiento Arkos San Pedro, Promotora Sierra del Sur S.A. de C.V. Morelia (tanque de recepción y reactor). Así como muestras de sedimento (250g) del Estero Barra de Pichi y del sedimentador de la planta de tratamiento. Todas las muestras se transportaron en hielo para el aislamiento de los bacteriófagos.

5.3 Enriquecimiento de muestras de agua para los aislamientos de los bacteriófagos.

Para el enriquecimiento de las muestras 140 ml de agua se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 min. Posteriormente el sobrenadante se colectó y filtró a través de una membrana con poro de 0.22 µm; se le agregó cloroformo (10 µl /ml filtrado) y se dejó reposar por 10 min. A continuación 10 ml del sobrenadante se mezclaron con 2 ml de caldo soya tripticaseína doblemente concentrado (TSA 2x) con MgSO₄ o CaCl₂ (10mM) que contenía una de las cepas hospederas de un total de 11 bacterias, así como una mezcla de éstas. Las mezclas se incubaron durante 30 min. Posteriormente se agregaron 10 ml de TSA 2x y se dejaron en incubación por 1 y 7 a 8 días de crecimiento a 28°C con agitación suave. Después del tiempo señalado, el

cultivo se centrifugó a 4,000 rpm durante 20 min, el sobrenadante se colectó, filtró y se le agregó cloroformo. Después se repitió la centrifugación a 4,000 rpm por 5 min y el sobrenadante se almacenó a 4°C (Bonilla *et al.*, 2016)

5.4 Detección de los bacteriófagos

Para la detección de los bacteriófagos se realizó una prueba de gota o con una versión modificada del método de agar TSA 2X de doble capa (Kazimierczak *et al.*, 2019). En el cual sobre una capa delgada de TSA 2X con 1.5% de agar y CaCl₂ (10mM) se vacía una capa de agar de cobertura o top agar (TSA 2X con 0.7% de agar) a 58°C, con una mezcla de 500 µl de la bacteria hospedera (previamente con ajuste a una densidad óptica de 0.8), más 85 µl de CaCl₂ 1M y se dejó solidificar a temperatura ambiente. A continuación, se agregaron 3 gotas de 20 µl del sobrenadante a evaluar para la presencia de los bacteriófagos y se incubó a 27°C por 24 hrs.

La morfología de las placas líticas de los bacteriófagos se utilizaron para diferenciar los bacteriófagos líticos y lisogénicos; las placas claras o transparentes indicaron la actividad lítica y las placas turbias correspondieron a los bacteriófagos **lisogénicos**. La ausencia de placas indicó la ausencia de los bacteriófagos en la muestra evaluada (Kropinski *et al.*, 2009; Manohar *et al.*, 2018; Ramesh *et al.*, 2019). En caso de observarse placas, se recortaron con puntas de micropipeta estériles que se utilizaron como sacabocados y para la elución de los bacteriófagos se siguió el procedimiento de Kazimierczak *et al.*, (2019). Brevemente el trozo de agar con la placa lítica se agitó en buffer SM (5.8 g NaCl, 2 g MgSO₄, 50 mL 1M Tris-HCl pH 7.5, 0.1 g de gelatina bacteriológica; aforar a 1L con H₂O destilada) por 1.5 h. Después se agregó cloroformo 50 µl/ml y se centrifugaron a 9,000 rpm por 5 min, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Para la propagación de las zonas de lisis, se procedió a un enriquecimiento de los sobrenadantes con la bacteria hospedera correspondiente durante 24-48 hrs. Asimismo se realizó la limpieza de los bacteriófagos como se mencionó previamente. Finalmente, para el aislamiento de las placas individuales, se realizaron diluciones en el buffer SM sobre el agar de doble

capa de TSA 2X, se describió la morfología y se midió el diámetro de las placas (mm) con un calibrador Vernier. Además, las placas líticas que se aislaron se recortaron con puntas estériles y se llevó a cabo la limpieza de los bacteriófagos para su almacenamiento en el buffer SM a 4°C. Estos sobrenadantes derivados de la placa lítica individual se consideraron como los bacteriófagos purificados.

6. RESULTADOS

6.1 Aislamiento de los bacteriófagos contra *Aeromonas* spp. y *Plesiomonas shigelloides*.

Respecto al análisis de las muestras para el aislamiento de los bacteriófagos se analizaron un total de seis muestras, cuatro correspondientes a muestras de agua, así como dos de sedimentos, uno del Estero de Barra de Pichi en Lázaro Cárdenas y del sedimentador de la planta de tratamiento de aguas residuales de Morelia. Se aislaron bacteriófagos únicamente cuando se empleó en los enriquecimientos CaCl_2 10 mM, en cuatro sitios de muestreo (Tabla 6).

Tabla 6. Sitios de muestreos con bacteriófagos.

Muestra	Tipo de muestra	Enriquecimiento de muestras para el aislamiento de los bacteriófagos	
		24 hrs	7-8 días
1	Agua de Río Balsas	-	+
2	Agua de mar Playa azul	-	-
3A	Agua de estero Barra de Pichi	-	-
3S	Sedimento de estero	-	-
4	Planta de tratamiento, tanque de recepción	+	+
5	Planta de tratamiento, reactor	+	+
6	Planta de tratamiento, sedimentador	+	+

Presencia (+), Ausencia (-).

Se aislaron un total de 31 mezclas con bacteriófagos de las cuales 28 corresponden al enriquecimiento con las cepas bacterianas individuales y 3 a los enriquecimientos con la mezcla de las 11 bacterias. Asimismo se avanzó en la propagación de las mezclas de los bacteriófagos y en el aislamiento de los bacteriófagos individuales, lo que permitió obtener 56 bacteriófagos, de los cuales 45 (80%) son procedentes del enriquecimiento primario de siete-ocho días y 11 (20%) del enriquecimiento de un día. La principal fuente de aislamiento de los bacteriófagos fue la planta de tratamiento de aguas residuales con el 91% de los bacteriófagos, particularmente en la muestra cuatro del tanque de recepción con 23 bacteriófagos correspondiente al 41% de los aislamientos. En el reactor y el sedimentador se obtuvieron 13 y 15 bacteriófagos, con el 23% y 27% respectivamente de los aislamientos (Tabla 7).

Tabla 7. Bacteriófagos obtenidos en las diluciones.

Número	Identificación fagos	Dilución de aislamiento	Tipo de bacteriófago	Cepa hospedera	Muestra	Condición de enriquecimiento primario (días)	
						1	8
1	BF1	10^{-4}	S	R6	5	X	
2	AF2	10^{-5}	S	R6	4	X	
3	GF1	10^{-5}	T	P6	4	X	
4	JF1	10^{-6}	S	P6	5	X	
5	IF2	10^{-7} A	S	A3	5	X	
6	IF2	10^{-7} B	S	A3	5	X	
7	RF1	10^{-3}	T	R6	4		X
8	MF1	10^{-7}	S	E5	4		X
9	NF1	10^{-7}	S	E5	5		X
10	KF	10^{-7}	S	E5	5	X	
11	OF1	10^{-3} cA	S	P6	4		X
12	OF1	10^{-3} cB	S	P6	4		X
13	OF1	10^{-3} cC	S	P6	4		X
14	OF1	10^{-3} cD	S	P6	4		X

15	QF1	10^{-3} cA	S	P6	6		X
16	QF1	10^{-3} cB	S	P6	6		X
17	QF1	10^{-3} cC	S	P6	6		X
18	QF1	10^{-3} cD	S	P6	6		X
19	YF1	10^{-7} A	S	A3	4		X
20	YF1	10^{-7} B	S	A3	4		X
21	WF1	10^{-5} A	T	O6	4		X
22	WF1	10^{-6} A	T	O6	4		X
23	UF1	10^{-8}	S	N1	4		X
24	VF1	10^{-7} A	T	N1	6		X
25	VF1	10^{-8} A	S	N1	6		X
26	VF1	10^{-8} B	S	N1	6		X
27	XF1	10^{-6} A	S	O6	5		X
28	XF1	10^{-6} B	S	O6	5		X
29	ZF1	10^{-6} A	S	A3	5		X
30	ZF1	10^{-6} B	S	A3	5		X
31	SF1	10^{-7}	S	R6	6		X
32	XF1	10^{-7}	S	O6	5		X
33	XF1	10^{-8} A	S	O6	5		X
34	XF1	10^{-8} B	S	O6	5		X
35	HF1	10^{-5} A	S	85	4	X	
36	HF1	10^{-5} B	S	85	4	X	
37	HF1	10^{-3} A	S	85	4	X	
38	HF1	10^{-3} B	S	85	4	X	
39	ACF1	10^{-3} A	S	85	4		X
40	ACF1	10^{-3} B	S	85	4		X
41	ABF1R6-3	10^{-5}	S	R6	4		X
42	ABF1P6-3	10^{-3}	S	P6	4		X
43	AAF1-A		S	Q6	4		X
44	AAF1-B		S	Q6	4		X
45	ADF1	10^{-6} A	S	85	6		X

46	ADF1	10^{-6} B	S	85	6		X
47	ADF1	10^{-6} C	S	85	6		X
48	ÑF1	10^{-3} A	S	E5	6		X
49	ÑF1	10^{-3} B	S	E5	6		X
50	ÑF1	10^{-4} C	S	E5	6		X
51	AEF1-N1-1	10^{-6}	S	N1	6		X
52	DF-e 10^{-2} a	10^{-7}	S	M2	1		X $\exists$
53	DF-e 10^{-2} a	10^{-7}	S	M2	1		X $\exists$
54	DF-e 10^{-2} b	10^{-8} A	S	M2	1		X $\exists$
55	DF-e 10^{-2} b	10^{-8} B	S	M2	1		X $\exists$
56	DF-e 10^{-2} b	10^{-7} C	S	M2	1		X $\exists$
					SUBTOTAL	11	45
						TOTALES	56

T=Fago Lítico, S=Fago Lisógeno, X $\exists$ =7 días de enriquecimiento.

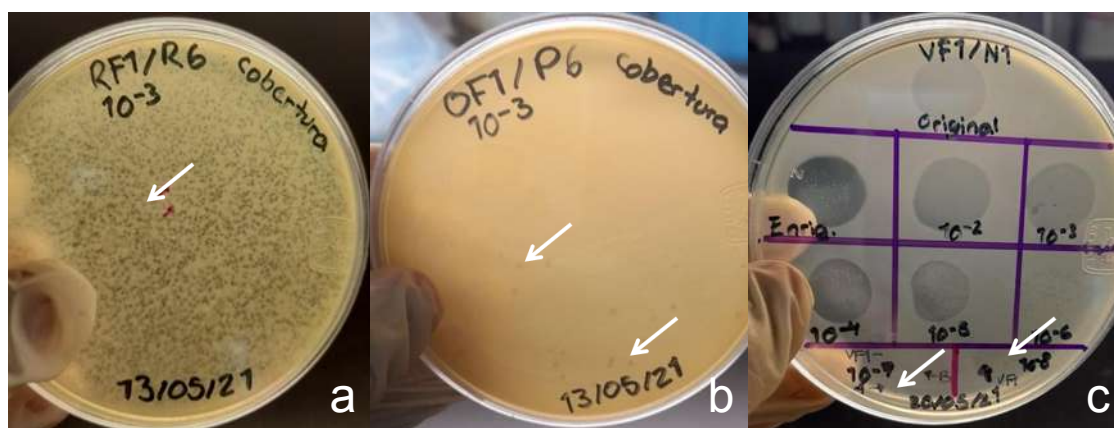


Figura 2. Placas de los bacteriófagos en el agar de doble capa:

a) Fagos líticos de *Aeromonas sobria*, b) Fagos lisogénicos de *Aeromonas bestiarum* y c) Diluciones empleadas para el aislamiento del bacteriófago VF1 de *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila*

Los 56 bacteriófagos fueron aislados a partir de cinco especies bacterianas procedentes de las granjas trutícolas (Fig. 2): *Aeromonas hydrophila* (19), *Aeromonas sobria* (18), *Aeromonas bestiarum* (11), *Aeromonas allosaccharophila* (6) y *Plesiomonas shigelloides* (2) (Tabla 8). Del total de los bacteriófagos se

identificaron cinco con actividad lítica procedentes de la planta de tratamiento: tres para *Aeromonas sobria*, uno para *Aeromonas bestiarum* y uno para *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* respectivamente.

Tabla 8. Bacteriófagos por bacterias hospederas

Cepa	Especie bacteriana	Órgano de aislamiento	Fuente de aislamiento	Número de fagos
A3	<i>Aeromonas sobria</i>	Riñón	Trucha arco iris <i>O. mykiss</i>	6
L3	<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	Bazo		0
N1	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	Bazo		5
30	<i>Aeromonas rivipollensis</i>	Hígado		0
E5	<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	Riñón		6
O6	<i>Aeromonas sobria</i>	Riñón		7
85	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Riñón		9
M2	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Bazo		5
P6	<i>Aeromonas bestiarum</i>	Bazo	Trucha dorada <i>O. chrysogaster</i>	11
Q6	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Bazo		2
R6	<i>Aeromonas</i>	Riñón		5

	<i>sobria</i>			
				56

Los bacteriófagos aislados se infectaron nuevamente en las bacterias con las que se aislaron para incrementar su título y continuar con su caracterización. Las concentraciones de los bacteriófagos líticos se encuentran desde 4.5×10^6 – 3.5×10^9 Unidades Formadoras de Placas (UFP)/ml (Tabla 9).

Tabla 9. Concentraciones de los bacteriófagos líticos

Identificación fagos	Tipo de bacteriófago	Cepa hospedera	Unidades Formadoras de Placas UFP/ml
RF1	T	R6	4.5×10^6
WF1	T	O6	2.5×10^7
WF1	T	O6	1×10^8
VF1	T	N1	3.5×10^9

7. DISCUSIÓN

La mayoría de los bacteriófagos se aíslan de diferentes fuentes ambientales como son los ríos, suelo y aguas residuales donde las bacterias hospederas se presentan. Una de las fuentes con números altos de partículas similares a virus (VLPs) son las aguas residuales, ya que presentan concentraciones de 10^8 – $10^{10}/\text{ml}^{-1}$, es decir, de 10–1000 veces la concentración más alta de VLP's en comparación con los ambientes acuáticos naturales, por lo que se sugiere como una de las fuentes más altas de los bacteriófagos (Tamaki *et al.*, 2012). En el presente estudio el 91% de los bacteriófagos se aislaron a partir de las muestras de la planta de tratamiento de agua residuales particularmente en el tanque de recepción, lo que coincide con estudios previos donde se reporta el aislamiento de bacteriófagos para *Aeromonas* spp. a partir de este tipo de aguas (Cruz *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2016; Kazimierczak *et al.*, 2019; Kawbe *et al.*, 2020). Los resultados *in vitro* permitieron aislar un total de 54 bacteriófagos para *Aeromonas* spp., procedentes de granjas trutícolas mediante el procedimiento del enriquecimiento de las muestras de agua con la adición de un catión Ca^{+2} , en el cual la muestra ambiental se incubaba en presencia de la bacteria hospedera durante varias horas o días para amplificar cualquier bacteriófago presente en la muestra (Hatfull, 2021; Van Charante *et al.*, 2021). En estudios previos se reporta que la adición de los cofactores catiónicos como el Ca^{+2} o Mg^{+2} , incrementa la adsorción de los bacteriófagos, ya que estos iones estabilizan la interacción débil del virión con los correspondientes receptores de la bacteria hospedadora (Chhibber *et al.*, 2013; Valle, 2016; Yazdi *et al.*, 2018; Raza *et al.*, 2018). Asimismo, los cationes divalentes juegan un rol importante en las diferentes etapas del ciclo de infección del fago. Incluso cada bacteriófago tiene su propia especificidad para un catión divalente particular, por lo que es esencial identificar que catión divalente y su concentración respectiva incrementa el título del bacteriófago (Chhibber *et al.*, 2013). En particular, solamente se aislaron bacteriófagos para *Aeromonas* spp. y *Plesiomonas shigelloides* en presencia del Ca^{+2} , lo cual coincide con lo señalado por Valle (2016), quien obtuvo una cantidad de bacteriófagos mayor para *Staphylococcus aureus* con el empleo de este cofactor y ningún bacteriófago

con Mg^{+2} . En el presente estudio se llevó a cabo el enriquecimiento extenso por ocho días lo que favoreció la cantidad de los bacteriófagos aislados, ya que se obtuvieron 45 de los bacteriófagos en comparación al enriquecimiento de 24 hrs con 11 bacteriófagos aislados. Son escasos los estudios con la extensión del enriquecimiento para el aislamiento de los bacteriófagos de *Aeromonas*. Recientemente con el enriquecimiento de cuatro días se aislaron 10 bacteriófagos líticos contra cepas de *A. hydrophila* (Kawbe et al., 2020). De los bacteriófagos aislados resultaron con actividad lítica GF1, RF1, WF1A5, WF1A6, VF1 para *A. hydrophila* subsp. *hydrophila*, *A. sobria* y *A. bestiarum*. Existen reportes previos de bacteriófagos líticos para las especies *A. hydrophila*, *A. hydrophila* subsp. *hydrophila*, *A. rivipollensis*, *A. salmonicida*, *A. veronii*, *A. sobria* y *A. caviae* (Flint, 1996; Jun et al., 2013; Cruz et al., 2014; Silva et al., 2016; Easwaran et al., 2017;; Anand 2018; Bai et al., 2019; Akmal et al., 2020; Leduc et al., 2021; Nithin et al., 2021; Pallavi et al., 2022). No obstante, este es el primer reporte en México del aislamiento de bacteriófagos para cepas de *Aeromonas* presentes en granjas trutícolas de Michoacán. Además es la primera vez que se reporta en la literatura un bacteriófago infectivo (GF1) para *Aeromonas bestiarum*, la cual es una bacteria patógena para los peces y en la presente investigación se encontró en una coinfección bacteriana responsable de mortalidades altas en los peces. Otra bacteria Gram negativa de importancia para la piscicultura es *Plesiomonas shigelloides*, ya que se reporta responsable de pérdidas importantes en la piscicultura (Behera et al., 2018; Fuentes et al., 2022). No obstante, son escasos los estudios relacionados al aislamiento de los bacteriófagos contra *Plesiomonas shigelloides*. En el presente estudio, se aislaron dos bacteriófagos lisogénicos de *Plesiomonas shigelloides* a partir del tanque de recepción de la planta de tratamiento de aguas residuales. Previamente se reporta el aislamiento de tres bacteriófagos líticos a partir del contenido gastrointestinal de dos peces dulceacuícolas en cultivo (*Ephippus orbis* y *Ctenopharyngodon idella*) (He y Yang, 2018; Zhang et al., 2021). De los cuales se evaluaron *in vivo* los efectos protectores del bacteriófago PSP01 procedente de la carpa herbívora mediante una inyección intraperitoneal en carpas herbívoras

infectadas con *P. shigelloides* y se reportó un aumento en la tasa de supervivencia del 33% (Zhang *et al.*, 2021).

El 91% de los bacteriófagos que se aislaron en el presente estudio se identificaron como lisogénicos, podrían ser útiles para la fagoterapia en la piscicultura. No obstante, se requeriría la utilización de la ingeniería genética para la obtención de variantes estrictamente líticas como se propone previamente por Monteiro *et al.*, (2018). Adicionalmente se requiere realizar la secuenciación del genoma de los bacteriófagos, con el objetivo de identificar las enzimas involucradas en su ciclo lítico, su posterior expresión y evaluación en el tratamiento de infecciones bacterianas en la piscicultura. Respecto a los cinco bacteriófagos líticos que se detectaron como candidatos potenciales para el biocontrol de *Aeromonas* spp. en los peces de cultivo, se requiere su caracterización genómica para descartar la presencia de genes lisogénicos, de resistencia a los antibióticos y de virulencia, con el fin de establecer la seguridad de estos bacteriófagos para su uso en la piscicultura. Asimismo, las concentraciones de los bacteriófagos líticos que se obtuvieron son de 4.5×10^6 – 3.5×10^9 , dichas concentraciones se encuentran en el intervalo de concentraciones aplicadas en los estudios *in vivo* para el biocontrol de infecciones por *Aeromonas* spp. en los peces dulceacuícolas (Imbeault *et al.*, 2006 ;Jun *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013; Easwaran *et al.*, 2017). Respecto a los aspectos económicos de la fagoterapia, existen algunos para la práctica clínica en humanos, donde se concluye que su costo es inferior al de los antibióticos, con un ahorro del 50% en la atención sanitaria (Międzybrodzki *et al.*, 2007; Międzybrodzki *et al.*, 2012; Reina y Reina, 2018). No obstante, en una investigación reportan que debido a la personalización de la fagoterapia en humanos se considera una terapia costosa (Kingwell 2015). Recientemente se ha demostrado que para mejorar la fagoterapia es importante aumentar la disponibilidad de los fagos y reducir los precios (Korinteli *et al.*, 2022). En la presente investigación, se realizó la estimación económica de la fagoterapia para su aplicación en granjas piscícolas; se consideró el material de laboratorio necesario para llevar a cabo la amplificación de los bacteriófagos terapéuticos para su administración en el agua. Asimismo, para comparar los costos de la fagoterapia vs. terapia antibiótica se hizo la estimación considerando la

administración de la Gentamicina, el cual es uno de los principales antibióticos de elección para el tratamiento de infecciones por *Aeromonas* spp. en las granjas piscícolas. En conclusión, la estimación de los costos de ambas terapias son similares. Como se mencionó anteriormente, la fagoterapia representa numerosas ventajas ambientales y terapéuticas en comparación al uso de antibióticos, no obstante es necesario realizar la evaluación *in vivo* para determinar el costo exacto de la fagoterapia por estanque.

8.- CONCLUSIONES

Se aislaron 54 bacteriófagos nuevos contra *Aeromonas* spp., de estos se detectaron 5 líticos que son candidatos para el biocontrol de *Aeromonas* spp. en peces de cultivo. Sin embargo, se requiere determinar la especificidad rango-hospedero; así como una caracterización genómica que permita descartar la presencia de genes lisogénicos, de resistencia a los antibióticos y de virulencia, con el fin de establecer la seguridad de estos bacteriófagos para su uso. Además se requieren estudios *in vivo* para reconocer su potencial como estrategia alternativa al uso de antibióticos en la acuicultura.

9.- LITERATURA CITADA

Ackermann H. W. 2007. 5500 **Phages examined in the electron microscope**. *Archives of virology*, 152(2), 227–243. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0849-1> .

Akmal, M., Rahimi-Midani, A., Hafeez-Ur-Rehman, M., Hussain, A., Choi, T. J. 2020. **Isolation, Characterization, and Application of a Bacteriophage Infecting the Fish Pathogen *Aeromonas hydrophila***. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9(3), 215. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030215>.

Anand, T., Bera, B. C., Virmani, N., Vaid, R. K., Vashisth, M., Tripathi, B. N. 2018. **Isolation and characterization of a novel, T7-like phage against *Aeromonas veronii***. *Virus genes*, 54(1), 160–164. <https://doi.org/10.1007/s11262-017-1517-0>

Aslam, B., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M. H., Baloch, Z. 2018. **Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis**. *Infection and drug resistance*, 11, 1645.

Azam, A.H., Tanji, Y. 2019. **Bacteriophage-host arm race: an update on the mechanism of phage resistance in bacteria and revenge of the phage with the perspective for phage therapy**. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(5), 2121–2131. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09629-x>

Bai, M., Cheng, Y. H., Sun, X. Q., Wang, Z. Y., Wang, Y. X., Cui, X. L., Xiao, W. 2019. **Nine novel phages from a plateau Lake in Southwest China: insights into *Aeromonas* phage diversity**. *Viruses*, 11(7), 615. <https://doi.org/10.3390/v11070615>

Barrera R., Cajero J.M., Oviedo B.J., Nuñez A. R., Kameyama K. L., Valdez A. J.J. 2015. **Advances in the use of endolysins: general remarks, structure, applications, genetic modifications and perspectives**. En: A. Mendez. (Ed.). **The Battle against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances**

and Educational Programs (pp. 259-268). Bajadoz España: Formatex Research Center. ISBN: 978-84-942134-6-5.

Batinovic, S., Wassef, F., Knowler, S. A., Rice, D., Stanton, C. R., Rose, J., Tucci, J., Nittami, T., Vinh, A., Drummond, G. R., Sobey, C. G., Chan, H. T., Seviour, R. J., Petrovski, S., Franks, A. E. 2019. **Bacteriophages in Natural and Artificial Environments**. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 8(3), 100. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030100>

Behera, B. K., Bera, A. K., Paria, P., Das, A., Parida, P. K., Kumari, S., Bhowmick, S., Das, B. K. 2018. **Identification and pathogenicity of *Plesiomonas shigelloides* in Silver Carp**. *Aquaculture*, 493, 314–318. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.063> .

Bhunias, A. K. 2018. **Opportunistic and Emerging Foodborne Pathogens: *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*, *Cronobacter sakazakii*, and *Brucella abortus***. En: Bhunias, A. (Ed). **Foodborne Microbial Pathogens** . Springer, New York, NY. pp. 343-350.

Björklund, H., J. Bondestam, and G. Bylund. 1990. **Residues of oxytetracycline in wild fish and sediments from fish farms**. *Aquaculture* 86:359–367. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(90\)90324-G](https://doi.org/10.1016/0044-8486(90)90324-G) .

Bonilla, N., Rojas, M. I., Cruz, G. N. F., Hung, S. H., Rohwer, F., Barr, J. J. 2016. **Phage on tap—a quick and efficient protocol for the preparation of bacteriophage laboratory stocks**. *PeerJ*, 4, e2261. <https://doi.org/10.7717/peerj.2261> .

Borella, L., Salogni, C., Vitale, N., Scali, F., Moretti, V. M., Pasquali, P., Alborali, G. L. 2020. **Motile aeromonads from farmed and wild freshwater fish in northern Italy: an evaluation of antimicrobial activity and multidrug resistance during 2013 and**

2016. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 62(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s13028-020-0504-y> .

Brüssow, H., Hendrix, R. W. 2002. **Phage genomics: small is beautiful.** *Cell*, 108(1), 13-16. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00637-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00637-7) .

Cabello, F. C., Godfrey, H. P., Tomova, A., Ivanova, L., Dölz, H., Millanao, A., Buschmann, A. H. 2013. **Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health.** *Environmental microbiology*, 15(7), 1917-1942. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12134> .

Carvalho, C., Costa, A. R., Silva, F., Oliveira, A. 2017. **Bacteriophages and their derivatives for the treatment and control of food-producing animal infections.** *Critical Reviews in Microbiology*, 1-19. <http://dx.doi.org/10.1080/1040841X.2016.1271309> .

Chhibber, S., Kaur, T., Kaur, S. 2014. **Essential role of calcium in the infection process of broad-spectrum methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteriophage.** *Journal of basic microbiology*, 54(8), 775–780. <https://doi.org/10.1002/jobm.201300051> .

Comisión Europea, 2003. **Council and Parliament prohibit antibiotics as growth promoters.** Disponible en: https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/IP_03_1058. (Accesada en Septiembre 2009).

Crothers S., Hoj, C., Bourne L., Hall D.G., Owens, M.R. 2010. **Isolation of lytic bacteriophage against *Vibrio harveyi*.** *Journal of applied microbiology*, 108(5), 1744–1750. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04578.x>

Cruz P., Candare D. M. A., Cometa, C. M. G., Gudez, G. L. S., D., Guevara, A. M. I. T., Relova, M. B. T. G., Papa, R. D. S. 2014. ***Aeromonas hydrophila* bacteriophage**

UP87: an alternative to antibiotic treatment for motile aeromonas septicemia in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Philippine Agricultural Scientist*, 97(1). ISSN 0031-7454.

Debarbieux, L., Leduc, D., Maura, D., Morello, E., Criscuolo, A., Grossi, O., Balloy, V., Touqui, L. 2010. **Bacteriophages can treat and prevent *Pseudomonas aeruginosa* lung infections.** *The Journal of infectious diseases*, 201(7), 1096–1104. <https://doi.org/10.1086/651135>.

Devarajan, N., Köhler, T., Sivalingam, P., Van Delden, C., Mulaji, C. K., Mpiana, P. T. Poté, J. 2017. **Antibiotic resistant *Pseudomonas* spp. in the aquatic environment: A prevalence study under tropical and temperate climate conditions.** *Water Research*, 115, 256-265. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.02.058>.

Dimitriu, T., Szczelkun, M. D., Westra, E. R. 2020. **Evolutionary Ecology and Interplay of Prokaryotic Innate and Adaptive Immune Systems.** *Current biology: CB*, 30(19), R1189–R1202. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.08.028>.

Doss, J., Culbertson, K., Hahn, D., Camacho, J., Barekzi, N. 2017. **A Review of Phage Therapy against Bacterial Pathogens of Aquatic and Terrestrial Organisms.** *Viruses*, 9(3), 50. <https://doi.org/10.3390/v9030050> .

Düring, K., Porsch, P., Fladung, M., Lörz, H. 1993. **Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora*.** *The Plant Journal*, 3(4), 587-598. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1993.03040587.x> .

Easwaran, M., Dananjaya, S. H. S., Park, S. C., Lee, J., Shin, H. J., De Zoysa, M. 2017. **Characterization of bacteriophage pAh-1 and its protective effects on experimental infection of *Aeromonas hydrophila* in Zebrafish (*Danio rerio*).** *Journal of fish diseases*, 40(6), 841-846. <https://doi.org/10.1111/jfd.12536> .

Egido, J. E., Costa, A. R., Aparicio-Maldonado, C., Haas, P. J., Brouns, S. J. J. 2022. **Mechanisms and clinical importance of bacteriophage resistance.** *FEMS microbiology reviews*, 46(1), fuab048. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab048>.

Ekundayo, T.C., Okoh, A.I. 2019. **Antimicrobial resistance in freshwater *Plesiomonas shigelloides* isolates: Implications for environmental pollution and risk assessment.** *Environmental Pollution*, 257. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113493>.

Flint, K. P. 1996. **A method for the enumeration of *Aeromonas* bacteriophage in aquatic environments.** *Letters in applied microbiology*, 22(3), 244-248.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2016. **Major bacterial diseases affecting aquaculture.** Disponible en: http://www.fao.org/fi/static-media/MeetingDocuments/WorkshopAMR_presentations/07_Haenen.pdf. (Accesada en Diciembre 2017).

Food and Drug Administration (FDA). 2022. **Approved Aquaculture Drugs.** Disponible en: <https://www.fda.gov/animal-veterinary/aquaculture/approved-aquaculture-drugs>. (Accesada en Octubre 2021).

Fuentes V.M. A., Gil C.A.C., Martínez P.C. A., Baizabal A. V. M., Valdez A. J. J. 2021. **El enemigo de mi amigo es... Un virus que ataca a las bacterias: los bacteriófagos.** *Revista Digital Universitaria (RDU)*, 22(4). <http://doi.org/10.22201/cuaieed.16076079e.2021.22.4.1>

Fuentes V.M. A., Osornio E. J. L., Martínez P.C. A., Contreras A. J. L., Barriga T. E., La Mora, G. I., Arellano T.A., Baizabal A.V.M., Bravo P. A., Cajero J. M., Valdez A. J. J. 2022. **Bacterial and parasite co-infection in Mexican golden trout (*Oncorhynchus chrysogaster*) by *Aeromonas bestiarum*, *Aeromonas sobria*, *Plesiomonas shigelloides* and *Ichthyobodo necator*.** *BMC veterinary research*, 18(1), 137. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03208-5>.

Gondil, V. S., Harjai, K., Chhibber, S. 2020. **Endolysins as emerging alternative therapeutic agents to counter drug-resistant infections.** *International journal of antimicrobial agents*, 55(2), 105844. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.11.001>

Gordillo Altamirano, F. L., Barr, J. J. 2019. **Phage therapy in the postantibiotic era.** *Clinical microbiology reviews*, 32(2). <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-18> .

Górski A., Mieczybrodzki R., Borysowski J., Dałbrowska K., Wierzbicki P., Ohams M., Korczak K.G., Olszowska Z. N., Łusiak- S. M., Kłak M., Jon E., Kaniuga E., Gołaoe A., Purchla S., Weber-Dałbrowska B., Letkiewicz S., Fortuna W., Szufnarowski K., Pawełczyk Z., Rogóż P., Kłosowska D. 2012. **Phage as a modulator of immune responses: practical implications for phage therapy.** *Advances in virus research*, 83:41–71. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394438-2.00002-5> .

Guttman, B., Raya, R., Kutter, E. 2005. **Basic phage biology.** *Bacteriophages: Biology and applications*, 4, 30-63.

Hao, H., Cheng, G., Iqbal, Z., Ai, X., Hussain, H.I., Huang, L., Dai, M., Wang, Y., Liu, Z., Yuan, Z. 2014. **Benefits and risks of antimicrobial use in food-producing animals.** *Frontiers in Microbiology*, 5, 288. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00288> .

Harper R. D., Abedon T.S., Burrowes, H.B. McConville L.M. 2021. **Bacteriophages: Biology, Technology, Therapy.** Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-41986-2>.

Hatfull, G. F. 2021. **Bacteriophage discovery and genomics.** *Bacteriophages: Biology, Technology, Therapy*, 219-230.

He, Y., Yang, H. 2015. **The gastrointestinal phage communities of the cultivated freshwater fishes.** *FEMS microbiology letters*, 362(5), fnu027. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnu027>.

Higuera, G., Roberto Bastías, R., Tsertsvadze, G., Romero, J., Espejo, R.T. 2013. **Recently discovered *Vibrio anguillarum* phages can protect against experimentally induced vibriosis in Atlantic salmon, *Salmo salar*.** *Aquaculture* 392–395, 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.02.013> .

Hoyles, L., McCartney, A. L., Neve, H., Gibson, G. R., Sanderson, J. D., Heller, K. J., Van Sinderen, D. 2014. **Characterization of virus-like particles associated with the human faecal and caecal microbiota.** *Research in microbiology*, 165(10), 803-812. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.10.006> .

Hu, Q., Lin Q., Shi C., Fu X., Li N., Liu L., Wu S. 2014. **Isolation and identification of a pathogenic *Plesiomonas shigelloides* from diseased grass carp.** *Wei Sheng Wu Xue Bao* 54:229–235. SIN DOI.

Huang, Y., Wang, W., Zhang, Z., Gu, Y., Huang, A., Wang, J., Hao, H. 2022. **Phage Products for Fighting Antimicrobial Resistance.** *Microorganisms*, 10(7), 1324. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071324> .

Imbeault, S., Parent, S., Lagacé, M., Uhland, C. F., & Blais, J. F. 2006. **Using bacteriophages to prevent furunculosis caused by *Aeromonas salmonicida* in farmed brook trout.** *Journal of Aquatic Animal Health*, 18(3), 203-214. <http://dx.doi.org/10.1577/H06-019.1>.

Jacobs, L., Chenia, H. Y. 2007. **Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African aquaculture systems.** *International journal of food microbiology*, 114(3), 295-306. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.030> .

Janda, J. M., Abbott, S. L., McIver, C. J. 2016. ***Plesiomonas shigelloides* Revisited**. *Clinical microbiology reviews*, 29(2), 349–374.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00103-15> .

Jian, Z., Zeng, L., Xu, T., Sun, S., Yan, S., Yang, L., Huang, Y., Jia, J., Dou, T. 2021. **Antibiotic resistance genes in bacteria: Occurrence, spread, and control**. *Journal of basic microbiology*, 61(12), 1049–1070.
<https://doi.org/10.1002/jobm.202100201> .

Jun, J. W., Han, J. E., Tang, K. F., Lightner, D. V., Kim, J., Seo, S. W., Park, S. C. 2016. **Potential application of bacteriophage pVp-1: Agent combating *Vibrio parahaemolyticus* strains associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp**. *Aquaculture*, 457, 100-103.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.02.018> .

Jun, J. W., Kim, J. H., Shin, S. P., Han, J. E., Chai, J. Y., Park, S. C. 2013. **Protective effects of the *Aeromonas* phages pAh1-C and pAh6-C against mass mortality of the cyprinid loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) caused by *Aeromonas hydrophila***. *Aquaculture*, 416, 289-295.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.09.045> .

Jun, S. Y., Jung, G. M., Yoon, S. J., Oh, M. D., Choi, Y. J., Lee, W. J., Kang, S. H. 2013. **Antibacterial properties of a pre-formulated recombinant phage endolysin, SAL-1**. *International journal of antimicrobial agents*, 41(2), 156-161.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.10.011> .

Jun, S. Y., Jung, G. M., Yoon, S. J., Youm, S. Y., Han, H. Y., Lee, J. H., Kang, S. H. 2016. **Pharmacokinetics of the phage endolysin-based candidate drug SAL 200 in monkeys and its appropriate intravenous dosing period**. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 43(10), 1013-1016.
<https://doi.org/10.1111/1440-1681.12613> .

Kabwe, M., Brown, T., Speirs, L., Ku, H., Leach, M., Chan, H. T. Tucci, J. 2020. **Novel bacteriophages capable of disrupting biofilms from clinical strains of *Aeromonas hydrophila***. *Frontiers in microbiology*, 11, 194. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00194> .

Kazimierczak, J., Wójcik, E. A., Witaszewska, J., Guziński, A., Górecka, E., Stańczyk, M. Dastyh, J. 2019. **Complete genome sequences of *Aeromonas* and *Pseudomonas* phages as a supportive tool for development of antibacterial treatment in aquaculture**. *Virology journal*, 16(1), 1-12.

Khan, A., Rao, T. S., Joshi, H. M. 2022. **Phage therapy in the Covid-19 era: Advantages over antibiotics**. *Current research in microbial sciences*, 3, 100115. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100115> .

Kim, J. H., Choresca, C. H., Shin, S. P., Han, J. E., Jun, J. W., Park, S. C. 2013. **Biological Control of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* Infection in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Using *Aeromonas* Phage PAS-1**. *Transboundary and emerging diseases*, 62(1), 81-86. <https://doi.org/10.1111/tbed.12088> .

Kim, J. H., Son, J. S., Choresca, C. H., Shin, S. P., Han, J. E., Jun, J. W., Park, S. C. 2012. **Complete genome sequence of bacteriophage phiAS7, a T7-like virus that infects *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida***. *Journal of virology*, 86(5), 2894-2895. <https://doi.org/10.1128/JVI.07131-11> .

Kim, S., Lee, D. W., Jin, J. S., Kim, J. 2020. **Antimicrobial activity of LysSS, a novel phage endolysin, against *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa***. *Journal of global antimicrobial resistance*, 22, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.01.005> .

Kingwell K. 2015. **Bacteriophage therapies re-enter clinical trials**. *Nature reviews. Drug discovery*, 14(8), 515–516. <https://doi.org/10.1038/nrd4695>.

Kirkan, Ş., Göksoy, E. Ö., Kaya, O. 2003. **Isolation and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas salmonicida* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey hatchery farms.** *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 50(7), 339-342. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2003.00671.x> .

Koonin, E. V., Makarova, K. S. 2019. **Origins and evolution of CRISPR-Cas systems.** *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 374(1772), 20180087. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0087>.

Korinteli, I., Phagava, H., & Pagava, K. 2019. **Peculiarities of Bacteriophages Use in Clinical Practice.** *Experimental and clinical medicine Georgia*, 47-51. <https://doi.org/10.52340/jecm.2019.01>

Kropinski, A. M., Mazzocco, A., Waddell, T. E., Lingohr, E., Johnson, R. P. 2009. **Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay.** En: Clokie, R.J.M., Kropinski, A.M. (Ed). **Bacteriophages: methods and protocols, volume 1: isolation, characterization, and interactions.** Humana Press. pp. 69-76.

Kümmerer, K. 2009. **Antibiotics in the aquatic environment—a review—part I.** *Chemosphere*, 75(4), 417-434. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.086> .

Labrie, S. J., Samson, J. E., Moineau, S. 2010. **Bacteriophage resistance mechanisms.** *Nature reviews. Microbiology*, 8(5), 317–327. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2315> .

Le, S., Yao, X., Lu, S., Tan, Y., Rao, X., Li, M., Lux, R. 2014. **Chromosomal DNA deletion confers phage resistance to *Pseudomonas aeruginosa*.** *Scientific reports*, 4. <https://doi.org/10.1038/srep04738>

Leduc, G. R., Paquet, V. E., Vincent, A. T., Charette, S. J. 2021. **Characterization of bacteriophage T7-Ah reveals its lytic activity against a subset of both mesophilic and psychrophilic *Aeromonas salmonicida* strains.** *Archives of Virology*, 166(2), 521-533.

Loc C.C., Abedon S.T. 2011. **Pros and cons of phage therapy**. *Bacteriophage* 1:111–114. <http://dx.doi.org/10.4161/bact.1.2.14590>.

Lomelí O. C. O., Martínez D. S. F. 2014. **Phage therapy against *Vibrio parahaemolyticus* infection in the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae**. *Aquaculture*, 434, 208-211. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.08.018>

Love, M. J., Bhandari, D., Dobson, R. C., Billington, C. 2018. **Potential for bacteriophage endolysins to supplement or replace antibiotics in food production and clinical care**. *Antibiotics*, 7(1), 17. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7010017>.

Mahony, J., McAuliffe, O., Ross, R. P., Van Sinderen, D. 2011. **Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens**. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), 157-163. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.10.008>.

Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A., Alkhnbashi, O. S., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Cheng, D., Haft, D. H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J. M., Scott, D., Shah, S. A., Siksnys, V., Terns, M. P., Venclovas, Č., White, M. F., Yakunin, A. F., Yan, W., Koonin, E. V. 2020. **Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants**. *Nature reviews. Microbiology*, 18(2), 67–83. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x>

Mangalea, M. R., Duerkop, B. A. 2020. **Fitness Trade-Offs Resulting from Bacteriophage Resistance Potentiate Synergistic Antibacterial Strategies**. *Infection and immunity*, 88(7), e00926-19. <https://doi.org/10.1128/IAI.00926-19>.

Manohar, P., Tamhankar, A. J., Lundborg, C. S., Ramesh, N. 2018. **Isolation, characterization and *in vivo* efficacy of *Escherichia* phage myPSH1131**. *PloS one*, 13(10), e0206278. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206278>.

Mäntynen, S., Laanto, E., Oksanen, H. M., Poranen, M. M., Díaz, M. S. L. 2021. **Black box of phage-bacterium interactions: exploring alternative phage**

infection strategies. *Open biology*, 11(9), 210188.
<https://doi.org/10.1098/rsob.21018>.

Melo, L. D., Oliveira, H., Pires, D. P., Dabrowska, K., Azeredo, J. 2020. **Phage therapy efficacy: a review of the last 10 years of preclinical studies.** *Critical Reviews in Microbiology*, 46(1), 78-99.

Menanteau-Ledouble, S., Kumar, G., Saleh, M., El-Matbouli, M. 2016. **Aeromonas salmonicida: updates on an old acquaintance.** *Diseases of aquatic organisms*, 120(1), 49-68. <https://doi.org/10.3354/dao03006> .

Międzybrodzki, R., Borysowski, J., Weber-Dąbrowska, B., Fortuna, W., Letkiewicz, S., Szufnarowski, K., Pawełczyk, Z., Rogóż, P., Kłak, M., Wojtasik, E., Górski, A. 2012. **Clinical aspects of phage therapy.** *Advances in virus research*, 83, 73–121.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394438-2.00003-7>

Międzybrodzki, R., Fortuna, W., Weber-Dąbrowska, B., Górski, A. 2007. **Phage therapy of staphylococcal infections (including MRSA) may be less expensive than antibiotic treatment.** *Advances in Hygiene and Experimental Medicine*, 61.

Monteiro, R., Pires, D. P., Costa, A. R., Azeredo, J. 2019. **Phage Therapy: Going Temperate?** *Trends in microbiology*, 27(4), 368–378.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.10.008>

National Center for Biotechnology Information (NCBI) Search database. Gene. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4156375>. (Accesada en Enero 2018).

Nisha, R. G., Rajathi, V., Manikandan, R., Prabhu, N. M. 2014. **Isolation of Plesiomonas shigelloides from infected cichlid fishes using 16S rRNA characterization and its control with probiotic Pseudomonas sp.** *Acta Scientiae Veterinariae*, 42(1), 1-7.

Nithin, M. S., Girisha, S. K., Kushala, K. B., Chandan, D. V., Puneeth, T. G., BT, N. K., Ramesh, K. S. 2021. **Novel lytic bacteriophages (AhFM4 & AhFM5) as bio-**

control measures against multidrug resistant biofilm producing *Aeromonas hydrophila* (AhZ1K). *Aquaculture*, 544, 737106.

Ofir, G., Melamed, S., Sberro, H., Mukamel, Z., Silverman, S., Yaakov, G., Doron, S., Sorek, R. 2018. **DISARM is a widespread bacterial defence system with broad anti-phage activities.** *Nature microbiology*, 3(1), 90–98. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0051-0>.

Olmos Soto, J., Paniagua Michel, J. J., Lopez, L., Ochoa Solano, L. 2015. **Functional feeds in aquaculture.** En: Kim, Se-Kwon (Eds.), **Handbook of Marine Biotechnology.** Springer. ISBN: 978-3-642-53970-1. Berlin. pp. 1303-1319.

Olszak, T., Latka, A., Roszniowski, B., Valvano, M. A., Drulis-Kawa, Z. 2017. **Phage Life Cycles Behind Bacterial Biodiversity.** *Current medicinal chemistry*, 24(36), 3987–4001. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170413100136> .

Organización mundial de la salud (OMS). 2021. La escasez mundial de antibióticos innovadores favorece la aparición y propagación de la farmacorresistencia. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/15-04-2021-global-shortage-of-innovative-antibiotics-fuels-emergence-and-spread-of-drug-resistance>. (Accesada en Agosto 2022).

Pallavi, B., Puneeth, T. G., Shekar, M., Girisha, S. K. 2021. **Isolation, characterization and genomic analysis of vB-AhyM-AP1, a lytic bacteriophage infecting *Aeromonas hydrophila*.** *Journal of Applied Microbiology*, 131(2), 695-705.

Parasion, S., Kwiatek, M., Gryko, R., Mizak, L., Malm, A. 2014. **Bacteriophages as an alternative strategy for fighting biofilm development.** *Polish journal of microbiology*. 63, 137–145.

Pelon,W., Luftig, R.B., Johnston, K.H. 2005. ***Vibrio vulnificus* load reduction in oysters after combined exposure to *V. vulnificus*-specific bacteriophage and an**

oyster extract component. *Journal of food protection*, 68(6), 1188–1191.
<https://doi.org/10.4315/0362-028x-68.6.1188J>

Pérez E.L., González, D., Leiva, J., Vitas, A. I. 2020. **Multidrug-Resistant Bacteria Isolated from Different Aquatic Environments in the North of Spain and South of France.** *Microorganisms*, 8(9), 1425.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8091425> .

Petrov V.M., Nolan J.M., Bertrand C., Levy D., Desplats C., Krisch H.M., Karam J.D. 2006. **Plasticity of the gene functions for DNA replication in the T4-like phages.** *Journal of molecular biology*, 361(1), 46–68.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.05.071>

Petrov, V. M., Ratnayaka, S., Nolan, J. M., Miller, E. S., Karam, J. D. 2010. **Genomes of the T4-related bacteriophages as windows on microbial genome evolution.** *Virology journal*, 7(1), 292. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-292> .

Piotrowska, M., Przygodzińska, D., Matyjewicz, K., Popowska, M. 2017. **Occurrence and variety of β -lactamase genes among *Aeromonas* spp. isolated from urban wastewater treatment plant.** *Frontiers in microbiology*, 8, 863.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00863> .

Rakonjac, J., Bennett, N. J., Spagnuolo, J., Gagic, D., Russel, M. 2011. **Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications.** *Current issues in molecular biology*, 13(2), 51–76.

Ramesh, N., Archana, L., Royam, M. M., Manohar, P., Eniyan, K. 2019. **Effect of various bacteriological media on the plaque morphology of *Staphylococcus* and *Vibrio* phages.** *Access Microbiology*, 1(4).

Rao, B. M., Lalitha, K. V. 2015. **Bacteriophages for aquaculture: are they beneficial or inimical.** *Aquaculture*, 437, 146-154. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.11.039> .

Raza, T., Andleeb, S., Ullah, S. R., Jamal, M., Mehmood, K., Ali, M. 2018. **Isolation and Characterization of a Phage to Control Vancomycin Resistant *Enterococcus Faecium*.** *Open life sciences*, 13, 553–560. <https://doi.org/10.1515/biol-2018-0066> .

Reina, J., Reina, N. 2018. **Fagoterapia ¿una alternativa a la antibioticoterapia?** *Revista española de quimioterapia*, 31(2), 101–104.

Rehman, S., Ali, Z., Khan, M., Bostan, N., Naseem, S. 2019. **The dawn of phage therapy.** *Reviews in medical virology*, 29(4), e2041. <https://doi.org/10.1002/rmv.2041>

Richter, L., Janczuk R., M., Niedziółka J.J., Paczesny J., Hołyst, R. 2018. **Recent advances in bacteriophage-based methods for bacteria detection.** *Drug Discovery Today*, 23(2), 448-455. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.11.007> .

Rohde, C., Resch, G., Pirnay, J. P., Blasdel, B. G., Debarbieux, L., Gelman, D., Górski, A., Hazan, R., Huys, I., Kakabadze, E., Łobocka, M., Maestri, A., Almeida, G. M. F., Makalatia, K., Malik, D. J., Mašlačňová, I., Merabishvili, M., Pantucek, R., Rose, T., Štveráková, D., ... Chanishvili, N. 2018. **Expert Opinion on Three Phage Therapy Related Topics: Bacterial Phage Resistance, Phage Training and Prophages in Bacterial Production Strains.** *Viruses*, 10(4), 178. <https://doi.org/10.3390/v10040178>.

Salmond, G. P., Fineran, P. C. 2015. **A century of the phage: past, present and future.** *Nature reviews. Microbiology*, 13(12), 777–786. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3564>

Samson J.E., Magadán A.H., Sabri M., Moineau, S. 2013. **Revenge of the phages: defeating bacterial defences.** *Nature Reviews Microbiology* 11:675–687. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3096> .

Sausset, R., Petit, M. A., Gaboriau-Routhiau, V., De Paepe, M. 2020. **New insights into intestinal phages.** *Mucosal immunology*, 13(2), 205–215. <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0250-5>

Schmelcher, M., Donovan, D. M., Loessner, M. J. 2012. **Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials.** *Future Microbiology*, 7(10), 1147–1171.

Shen, C. J., Liu, Y. J., Lu, C. P. 2012. **Complete genome sequence of *Aeromonas hydrophila* phage CC2.** *Journal of virology*, 86(19), 10900-10900. <https://doi.org/10.1128/JVI.01882-12> .

Silva, Y. J., C. Moreirinha, C. Pereira, L. Costa, Rocha R. J., Cunha A., Gomes N. C., Calado R., Almeida A. 2016. **Biological control of *Aeromonas salmonicida* infection in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*) with Phage AS-A.** *Aquaculture*, 450: 225–233 <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.025> .

Somerville, V., Schowing, T., Chabas, H., Schmidt, R. S., von Ah, U., Bruggmann, R., Engel, P. 2022. **Extensive diversity and rapid turnover of phage defense repertoires in cheese-associated bacterial communities.** *Microbiome*, 10(1), 137. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01328-6>.

Sorum, H. 2006. **Antimicrobial drug resistance in fish pathogens.** En : Aarestrup, F. M. (Ed). ***Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin.*** American Society of Microbiology. pp. 213-238

Stock, I., Wiedemann, B. 2001. **Natural antimicrobial susceptibilities of *Plesiomonas shigelloides* strains.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(6), 803-811. <https://doi.org/10.1093/jac/48.6.803> .

Sulakvelidze, A., Kutter, E. 2005. **Bacteriophage Therapy in Humans.** En: Kutter, E. Sulakvelidze, A., (Eds). **Bacteriophages: biology and applications.** CRC-PRESS. EUA. pp. 381-426.

Tamaki, H., Zhang, R., Angly, F. E., Nakamura, S., Hong, P. Y., Yasunaga, T., Liu, W. T. 2012. **Metagenomic analysis of DNA viruses in a wastewater treatment plant in tropical climate.** *Environmental microbiology*, 14(2), 441-452. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02630.x>

Theodoropoulos, C., Wong, T. H., O'Brien, M., Stenzel, D. 2001. ***Plesiomonas shigelloides* enters polarized human intestinal Caco-2 cells in an *in vitro* model system.** *Infection and immunity*, 69(4), 2260–2269. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.4.2260-2269.2001> .

Valdez A. J.J. 2017. **Bacteriophage therapy: what is needed for success?.** J. Microb. Biotechnol. Rep. 1:6-7.

Valle, H.N.A. 2016. **Aislamiento y caracterización de bacteriófagos que lisan a cepas epidemiológicamente relevantes de *Staphylococcus aureus* causantes de mastitis bovina.** Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 99 pp.

Van Charante F., Holtappels D., Blasdel B., Burrowes B.H. 2021. **Isolation of Bacteriophages.** en: Harper D.R., Abedon S.T., Burrowes B.H., McConville M.L. (eds) **Bacteriophages.** Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41986-2_14.

Verner J. D. W., Algoet, M., Pond, M. J., Virdee, H. K., Bagwell, N. J., Roberts, E. G. 2007. **Furunculosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) is not readily**

controllable by bacteriophage therapy. *Aquaculture*, 270(1-4), 475-484. :
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.05.023>.

Vincent, A. T., Paquet, V. E., Bernatchez, A., Tremblay, D. M., Moineau, S., Charette, S. J. 2017. **Characterization and diversity of phages infecting *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*.** *Scientific Reports*, 7(1), 7054.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-07401-7> .

Wang, W., Li, M., Lin, H., Wang, J., Mao, X. 2016. **The *Vibrio parahaemolyticus*-infecting bacteriophage qdvp001: genome sequence and endolysin with a modular structure.** *Archives of virology*, 161(10), 2645-2652.
<https://doi.org/10.1007/s00705-016-2957-x> .

Watson, B. N. J., Steens, J. A., Staals, R. H. J., Westra, E. R., Van Houte, S. 2021. **Coevolution between bacterial CRISPR-Cas systems and their bacteriophages.** *Cell host & microbe*, 29(5), 715–725.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.03.018>.

Wu, C. J., Ko, W. C., Lee, N. Y., Su, S. L., Li, C. W., Li, M. C., Chen, P. L. 2019. ***Aeromonas* isolates from fish and patients in Tainan City, Taiwan: genotypic and phenotypic characteristics.** *Applied and environmental microbiology*, 85(21), e01360-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.01360-19>. <https://doi.org/10.1128/AEM.01360-19>

Yazdi, M., Bouzari, M., Ghaemi, E. A. 2018. **Isolation and Characterization of a Lytic Bacteriophage (vB_PmiS-TH) and Its Application in Combination with Ampicillin against Planktonic and Biofilm Forms of *Proteus mirabilis* Isolated from Urinary Tract Infection.** *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 28(1), 37–46. <https://doi.org/10.1159/000487137> .

Zduńczyk, S., Janowski, T. 2020. **Bacteriophages and associated endolysins in therapy and prevention of mastitis and metritis in cows: Current knowledge.** *Animal Reproduction Science*, 106504.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106504> .

Zermeño, C. L. A., Makarov, R., Lomelí, O., C. O., Martinez, D. S. F., Cardona, F. C. S. 2018. **Recombinant Lys VPMS 1 as an endolysin with broad lytic activity against *Vibrio parahaemolyticus* strains associated to acute hepatopancreatic necrosis disease.** *Aquaculture Research*, 49(4), 1723-1726. <https://doi.org/10.1111/are.13577> .

Zhang, H., Bao, H., Billington, C., Hudson, J. A., Wang, R. 2012. **Isolation and lytic activity of the *Listeria* bacteriophage endolysin LysZ5 against *Listeria monocytogenes* in soya milk.** *Food microbiology*, 31(1), 133-136. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.01.005> .

Zhang, J., Xu, H., Yang, H., Li, J., Xiao, S., Hu, S., Yan, F., Xia, L., Zhang, Y. 2021. **Screening of a *Plesiomonas shigelloides* phage and study of the activity of its lysis system.** *Virus research*, 306, 198581. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198581>.

Zhang, Y., Liao, Y. T., Salvador, A., Sun, X., Wu, V. C. 2020. **Prediction, diversity, and genomic analysis of temperate phages induced from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains.** *Frontiers in microbiology*, 10, 3093.

Zhao, Y., Yang, Q. E., Zhou, X., Wang, F. H., Muurinen, J., Virta, M. P., Zhu, Y. G. 2021. **Antibiotic resistome in the livestock and aquaculture industries: Status and solutions.** *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 51(19), 2159-2196. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1777815> .

VII. DISCUSIÓN GENERAL

En la acuicultura existe un interés creciente en el desarrollo de alternativas ambientalmente amigables para la prevención y el tratamiento de las infecciones bacterianas (Donati *et al.*, 2022). Además, es la industria de producción de alimentos de más rápido crecimiento (Culot *et al.*, 2019) y se prevé que suministrará la mayor parte de las proteínas alimentarias de origen acuático para el 2050 (Stentiford *et al.*, 2020). Este aumento en la producción acuícola podría realizarse mediante la intensificación de la producción, lo que aumentará la aparición y propagación de enfermedades bacterianas (Rico *et al.*, 2012; Boyd *et al.*, 2022). Por lo cual, podrían implementarse estrategias y alternativas al uso de los antibióticos, como la fagoterapia, para el biocontrol de los brotes infecciosos, con la finalidad de evitar las pérdidas productivas y disminuir el impacto ambiental. Como una de las estrategias iniciales de la fagoterapia, es necesaria la identificación de las bacterias responsables de los brotes infecciosos, con la finalidad de aplicar los bacteriófagos específicos (Culot *et al.*, 2019), dichos virus infectan exclusivamente a las bacterias y son sus enemigos naturales. Los bacteriófagos reconocen de manera específica a las bacterias que invadirán por lo que dejan intactas a otras bacterias benéficas. Además, no infectan a los humanos, animales o a las plantas (Fuentes *et al.*, 2021). En el presente estudio se identificaron las *Aeromonas* spp. y *Plesiomonas shigelloides* epidemiológicamente relevantes en el cultivo de Salmónidos en Michoacán, por estar involucradas en los brotes infecciosos donde ocasionaron mortalidades altas o por aislarse a partir de los órganos internos de los peces y su frecuencia de aislamiento. Asimismo, se obtuvo una colección de los bacteriófagos para las *Aeromonas* spp. y *Plesiomonas shigelloides*, con la finalidad de conformar un cóctel de bacteriófagos que pueda ser útil en acuicultura.

Recientemente se planteó la conformación de los biobancos de los bacteriófagos y sus productos (lisinas) para los patógenos de peces (Ramos *et al.*, 2021), lo cual es importante para la implementación de soluciones rápidas ante el desarrollo inicial del brote bacteriano. No obstante, en México se requiere todavía de los marcos legales

que regulen la fagoterapia. El uso de los bacteriófagos en algunos países como en los Estados Unidos, Canadá e Israel se encuentra con autorización exclusiva para la industria alimentaria (Virkram *et al.*, 2022). Desde el 2006, la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU (FDA) aprobó el primer producto de bacteriófagos con aplicación directa en los alimentos para el biocontrol del patógeno *Listeria monocytogenes*. No obstante, la aprobación reglamentaria de las terapias que se basan en los bacteriófagos sigue enfrentándose a otros retos, entre ellos la farmacocinética, seguridad y eficacia de la fabricación; así como la patentabilidad (Sarhan y Azzazy, 2015). El código de los Estados Unidos considera a los bacteriófagos como productos biológicos (U.S. Government, 2017).

La fagoterapia no sólo avanza en la obtención de la aprobación reglamentaria, sino además en la realización de diversos ensayos clínicos (Fauconnier, 2019). En los últimos siete años existe un incremento de reportes que confirman las particularidades de los bacteriófagos en la medicina como una terapia innovadora y altamente personalizada (Pirnay *et al.*, 2022, Strathdee *et al.*, 2023). Aunque su uso en los humanos se abandonó en los países occidentales en favor de las terapias con antibióticos, la fagoterapia siguió en la práctica en el este de Europa (Chanishvili, 2016). Mientras tanto, algunos clínicos e investigadores exploran soluciones nacionales para acelerar la disponibilidad de la fagoterapia para el tratamiento de un número creciente de pacientes desesperados. Hasta el momento, se registran los ensayos clínicos de la fagoterapia en los humanos con aprobación por la FDA y/o la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) en los Estados Unidos, Australia, Francia y Bélgica donde se administró en diversas rutas tales como la oral, nasal, intravenosa y cutánea. La legislatura europea considera a la terapia bacteriofágica como un “Producto Médico de Terapia Avanzada”, es decir, como una terapia no necesariamente como un producto farmacéutico (Fauconnier, 2019). En la medida en que existan un mayor número de eventos que demuestren el éxito de la terapia bacteriofágica, será posible plantear mejores esquemas regulatorios para su aplicación (Ruvalcaba *et al.*, 2022). No obstante, en algunos países como Bangladesh, Georgia y el Reino Unido, se reportan ensayos clínicos en humanos sin aprobación por la EMA o FDA (Pirnay *et al.*, 2022).

Actualmente la EMA actualizó las directrices sobre la calidad, seguridad y eficacia de los productos veterinarios que se basan en la fagoterapia, los considera como productos biológicos que no se propagan en las células eucariotas, y por lo tanto, no se espera que ejerzan efectos farmacológicos directos en animales diana. Sin embargo, debido a la posible presencia de contaminación microbiológica en los productos de los bacteriófagos, como las endotoxinas o exotoxinas que se liberan durante la lisis bacteriana se consideran un problema de seguridad (EMA, 2023). Por lo que deben desarrollarse técnicas de purificación estándar para obtener preparaciones de los bacteriófagos con calidad clínica (Sarhan y Azzazy, 2015).

Además los bacteriófagos deben caracterizarse, demostrar que son líticos y no presentar determinantes genéticos que confieran lisogenia al fago, virulencia o resistencia a los antibióticos. Por lo tanto, el control de estos aspectos es un elemento esencial del proceso de manufactura (EMA, 2023), que se lograría a través de la implementación de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM); ya que se consideran el estándar de oro para la calidad y seguridad de los medicamentos (Pirnay *et al.*, 2022). Asimismo, la EMA reconoce que los productos fágicos necesitarán actualizarse periódicamente debido al desarrollo de resistencias y a los cambios en la epidemiología del patógeno bacteriano (EMA, 2023). Recientemente se considera que el futuro de la fagoterapia puede avanzar en colaboración con la implementación de centros nacionales de bacteriófagos y las autoridades competentes internacionales (Fauconnier, 2019; Pirnay *et al.*, 2022). Además la fagoterapia requiere de acciones globales, como es la participación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), lo cual es esencial para el desarrollo de la fagoterapia en general, para evitar los errores del pasado, como los relacionados con el uso desconsiderado de los antibióticos. Como tal, la OMS está especialmente bien situada para impulsar este proceso gracias a su red de oficinas regionales y nacionales (Fauconnier *et al.*, 2020). Por lo que dentro de los obstáculos a la puesta en marcha de la fagoterapia se incluyen retos logísticos y normativos, pero se consideran superables (Strathdee *et al.*, 2023).

Actualmente en México la fagoterapia se encuentra en fase de investigación para el sector acuícola, no obstante podría desarrollarse para el control de las bacterias patógenas de importancia en la salud humana y en el sector agropecuario en general, por lo que el futuro de esta terapia parece prometedor en sinergia o sustitución de la terapia antibiótica. Asimismo, la terapia con las endolisinas representa una alternativa por las numerosas ventajas en comparación al uso de los bacteriófagos y los antibióticos, que podría investigarse para la piscicultura. Aunque la fagoterapia en algunos países se encuentra autorizada para el uso de alimentos o animales en México, por el momento no existe el marco normativo para su aplicación. Asimismo, las investigaciones en México se han encaminado experimentalmente en laboratorios, por lo que es necesario evaluar la fagoterapia en los sistemas productivos con las condiciones naturales del desarrollo de la enfermedad.

La formulación del cóctel de bacteriófagos en estudios previos, se plantea como una solución para evitar el desarrollo de resistencia a la fagoterapia. Así como ampliar el intervalo de los hospederos bacterianos (Merabishvili *et al.*, 2018; Culot *et al.*, 2019;), debido a que existen numerosos reportes en la piscicultura sobre la presencia de las coinfecciones bacterianas (Assis *et al.*, 2016; Abdelsalam *et al.*, 2021; Mohammed y Peatman, 2018; Puneeth *et al.*, 2021; Sulumane *et al.*, 2021; Fuentes *et al.*, 2022).

Las coinfecciones son comunes en la naturaleza, pueden alterar el proceso de infección de la enfermedad, aumentar las tasas de mortalidad y dificultar los tratamientos terapéuticos (Wise *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2022). Se considera que en los sistemas de acuicultura, la situación real de las enfermedades es mucho más compleja que “un patógeno – una enfermedad” (Kunttu *et al.*, 2021). Es importante señalar que en el presente estudio, se reportó una coinfección en una de las granjas analizadas entre los patógenos bacterianos: *Aeromonas bestiarum*, *Aeromonas sobria* y *Plesiomonas shigelloides*, con el ectoparásito *Ichthyobodo necator* (Fuentes *et al.*, 2022). Se realizó el análisis de la susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos bacterianos para un mejor manejo de las coinfecciones en la piscicultura, detectándose en las bacterias, la presencia de resistencia a los

antibióticos del tipo β -lactámicos. Lo cual sugiere la adquisición de los determinantes genéticos a partir de la contaminación del agua por las actividades antropogénicas.

Finalmente la presencia de especies bacterianas en la piscicultura con potencial patogénico en la salud humana y en animales domésticos, sugiere que es necesario su monitoreo constante a través de la identificación molecular, ya que esto permite la discriminación de las especies bacterianas patógenas. Recientemente las *Aeromonas spp.* y *Plesiomonas shigelloides* se consideran como patógenos emergentes, por lo que es de suma importancia la vigilancia de su resistencia a los antimicrobianos. En la presente investigación se detectaron bacterias resistentes a una amplia variedad de antibióticos en los sistemas de producción piscícola, lo cual indica la necesidad inmediata de estrategias nuevas para el control de las infecciones bacterianas más comunes. Ya que fue factible el aislamiento de los bacteriófagos *in vitro* para las bacterias epidemiológicamente relevantes en el cultivo de la trucha arcoíris, se confirma que la fagoterapia presenta un importante potencial como estrategia alternativa al uso de los antibióticos en el sector piscícola en México. No obstante, se requiere de investigación adicional, como es la caracterización genómica de los bacteriófagos líticos que se identificaron como candidatos al biocontrol, ya que es una estrategia esencial para evaluar su seguridad, garantizando la ausencia de genes de resistencia a los antibióticos o de factores de virulencia, que puedan ser transducidos a las bacterias receptoras (Merabishvili *et al.*, 2018). Además de realizar el escalamiento de la producción de los bacteriófagos e implementar las evaluaciones de la fagoterapia vs. bacterias patógenas *in vivo*.

VIII. CONCLUSIONES GENERALES

- 1) Debido a que se detectó una prevalencia alta de las *Aeromonas* spp. y que algunas especies se reportan como patógenos primarios de peces y mamíferos, se requiere la mejora en las medidas de bioseguridad para proteger a los peces de infecciones por *Aeromonas* spp. ya que se identificó un factor de riesgo asociado al trabajador, cuando tiene aves de corral en su casa. Asimismo, se identificaron dos factores de la granja asociados con la protección, como el abastecimiento de agua a partir de manantial y la disposición de los desechos de los peces fuera de la instalación acuícola.
- 2) Este es el primer reporte del aislamiento simultáneo de *Aeromonas bestiarum*, *Aeromonas sobria* y *Plesiomonas shigelloides* en una trucha nativa con categoría de riesgo.
- 3) Se detectaron bacterias resistentes para una amplia variedad de antibióticos en los sistemas de producción piscícola, que no son de uso para el tratamiento de las infecciones bacterianas en las granjas. Lo cual sugiere la adquisición de los determinantes genéticos a partir de la contaminación del agua por las actividades humanas o relacionadas con el ganado.
- 4) Se detectaron cinco bacteriófagos líticos que son candidatos para el biocontrol de *Aeromonas* spp. en peces de cultivo. Sin embargo, se requiere determinar la especificidad o rango-hospedero; así como una caracterización genómica que permita establecer la seguridad de estos bacteriófagos para su uso. Además se requieren implementar los desafíos *in vivo* para reconocer su efectividad como estrategia alternativa al uso de antibióticos para el alcance de una acuicultura sustentable.

IX. PERSPECTIVAS GENERALES

Los resultados de la presente investigación confirman que la fagoterapia es una estrategia de biocontrol alternativa al uso de los antibióticos en el sector piscícola en México. No obstante, se requiere de investigación adicional, como la caracterización genómica de los bacteriófagos líticos que se identificaron como candidatos al biocontrol, con el objetivo de establecer su bioseguridad. Asimismo, para identificar el potencial de la fagoterapia en infecciones *in vivo*, se requiere el escalamiento de la producción de los bacteriófagos e implementar las evaluaciones de la fagoterapia para determinar su efectividad. Ya que la fagoterapia es específica, es necesario continuar la investigación en la caracterización de las *Aeromonas* spp. que se aislaron y de otras especies bacterianas de importancia en el sector piscícola, con la finalidad de contar con colecciones bacterianas que permitan el aislamiento rápido de bacteriófagos útiles para el biocontrol y conformar los biobancos de los bacteriófagos vs. patógenos bacterianos presentes en México.

X. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

Abdelsalam, M., Ewiss, M. Z., Khalefa, H. S., Mahmoud, M. A., Elgendy, M. Y., Abdel-Moneam, D. A. 2021. **Coinfections of *Aeromonas* spp., *Enterococcus faecalis*, and *Vibrio alginolyticus* isolated from farmed Nile tilapia and African catfish in Egypt, with an emphasis on poor water quality.** *Microbial Pathogenesis*, 160, 105213. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105213>.

Agencia Europea de Medicamentos (EMA). 2023. **Quality, safety and efficacy of bacteriophages as veterinary medicines - Scientific guideline.** Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/quality-safety-efficacy-bacteriophages-veterinary-medicines-scientific-guideline>. (Accesada en Febrero de 2023).

Anjur, N., Sabran, S. F., Daud, H. M., Othman, N. Z. 2021. **An update on the ornamental fish industry in Malaysia: *Aeromonas hydrophila*-associated disease and its treatment control.** *Veterinary world*, 14(5), 1143–1152. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1143-115>.

Assane, I. M., de Sousa, E. L., Valladão, G. M. R., Tamashiro, G. D., Criscoulo-Urbinati, E., Hashimoto, D. T., Pilarski, F. 2021. **Phenotypic and genotypic characterization of *Aeromonas jandaei* involved in mass mortalities of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) in Brazil.** *Aquaculture*, 541, 736848.

Assis, G. B. N., Tavares, G. C., Pereira, F. L., Figueiredo, H. C. P., Leal, C. A. G. 2017. **Natural coinfection by *Streptococcus agalactiae* and *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in farmed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.).** *Journal of fish diseases*, 40(1), 51-63. <https://doi.org/10.1111/jfd.12493>.

Barrera R. C. I., Cajero J. M., Oviedo B. J., Nuñez A. R. E., Kameyama K. L., Valdez A. J. J. 2015. **Advances in the use of endolysins: general remarks, structure, applications, genetic modifications and perspectives.** *The battle against microbial pathogens: basic science, technological advances and educational programs*, 1, 259-268.

Behera, B. K., Bera, A. K., Paria, P., Das, A., Parida, P. K., Kumari, S., Bhowmick, S., Das, B. K. (2018). **Identification and pathogenicity of *Plesiomonas shigelloides* in Silver Carp.** *Aquaculture*, 493, 314–318.

Boyd, C.E., McNevin, A.A. Davis, R.P. 2022. **The contribution of fisheries and aquaculture to the global protein supply.** *Food Security*. 14, 805–827. <https://doi.org/10.1007/s12571-021-01246-9>.

Capkin, E., Ozdemir, S., Ozturk, R. C., Altinok, I. 2017. **Determination and transferability of plasmid-mediated antibiotic resistance genes of the bacteria isolated from rainbow trout.** *Aquaculture Research*, 48(11), 5561–5575. <https://doi.org/10.1111/are.13378>.

Carvalho, C., Costa, A. R., Silva, F., Oliveira, A. 2017. **Bacteriophages and their derivatives for the treatment and control of food-producing animal infections.** *Critical reviews in microbiology*, 43(5), 583–601. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1271309>

Catalao, M. J., Gil, F., Moniz P., J., Sao, J. C., Pimentel, M. 2013. **Diversity in bacterial lysis systems: bacteriophages show the way.** *FEMS microbiology reviews*, 37(4), 554-571. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12006>.

Changotra, R., Chalotra, A., Rajput, H. 2022. **Antibiotics and Resistance in Environment.** En: Akhtar, N., Singh, K.S., Prerna, Goyal, D. (eds). **Emerging Modalities in Mitigation of Antimicrobial Resistance** Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-84126-3_2 . pp. 23-46.

Chanishvili, N. 2016. **Bacteriophages as therapeutic and prophylactic means: summary of the Soviet and post-Soviet experiences.** *Current Drug Delivery*, 13(3), 309-323.

Cruz, J. M., Saraiva, A., Eiras, J. C., Branco, R., Sousa, J. C. (1986). **An outbreak of *Plesiomonas shigelloides* in farmed rainbow trout, *Salmo gairdneri***

Richardson, in Portugal. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists (Denmark).*

Culot, A., Grosset, N., Gautier, M. 2019. **Overcoming the challenges of phage therapy for industrial aquaculture: A review.** *Aquaculture*, 513, 734423.

Dien, L. T., Ngo, T. P. H., Nguyen, T. V., Kayansamruaj, P., Salin, K. R., Mohan, C. V., Dong, H. T. 2022. **Non-antibiotic approaches to combat motile *Aeromonas* infections in aquaculture: Current state of knowledge and future perspectives.** *Reviews in Aquaculture*, 15(1) pp 333-336.
<https://doi.org/10.1111/raq.12721>.

Donati, V. L., Madsen, L., Middelboe, M., Strube, M. L., Dalsgaard, I. 2022. **The Gut Microbiota of Healthy and *Flavobacterium psychrophilum*-Infected Rainbow Trout Fry Is Shaped by Antibiotics and Phage Therapies.** *Frontiers in microbiology*, 13, 771296. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.771296>

Duarte, S., Zauli, D. A. G., Nicoli, J. R., Araújo, F. G. (2014). **Gram-negative intestinal indigenous microbiota from two Siluriform fishes in a tropical reservoir.** *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(4), 1283-1292.

Fauconnier, A. 2019. **Phage therapy regulation: from night to dawn.** *Viruses*, 11(4), 352. <https://doi.org/10.3390/v11040352>.

Fauconnier, A., Nagel, T. E., Fauconnier, C., Verbeken, G., De Vos, D., Merabishvili, M., Pirnay, J. P. 2020. **The Unique Role That WHO Could Play in Implementing Phage Therapy to Combat the Global Antibiotic Resistance Crisis.** *Frontiers in microbiology*, 11, 1982. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01982>.

Fečkaninová, A., Koščová, J., Mudroňová, D., Popelka, P., Toropilova, J. (2017). **The use of probiotic bacteria against *Aeromonas* infections in salmonid aquaculture.** *Aquaculture*, 469, 1-8.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.11.042>

Fuentes V. M.A., Gil C. A.C., Martínez P. C.A., Baizabal A. V.M., Valdez A. J.J. 2021. **El enemigo de mi enemigo es.....un virus que ataca a las bacterias.** *Revista Digital Universitaria*, 22(4) UNAM. <https://doi.org/10.22201/cuaieed.16076079e.2021.22.4.1>

Fuentes V.M. A., Osornio E. J. L., Martínez P. C. A., Contreras Á. J. L., Barriga T. E., Ingle D.M. G. Valdez Alarcón, J. J. 2022. **Bacterial and parasite co-infection in Mexican golden trout (*Oncorhynchus chrysogaster*) by *Aeromonas bestiarum*, *Aeromonas sobria*, *Plesiomonas shigelloides* and *Ichthyobodo necator*.** *BMC Veterinary Research*, 18:137. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03208-5>.

Gonçalves Pessoa, R. B., de Oliveira, W. F., Marques, D. S. C., Dos Santos Correia, M. T., de Carvalho, E. V. M. M., Coelho, L. C. B. B. 2019. **The genus *Aeromonas*: A general approach.** *Microbial pathogenesis*, 130, 81–94. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.02.036>

Heuer, O. E., Kruse, H., Grave, K., Collignon, P., Karunasagar, I., Angulo, F. J. 2009. **Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture.** *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 49(8), 1248–1253. <https://doi.org/10.1086/605667>.

Hu, Q., Lin Q., Shi C., Fu X., Li N., Liu L., Wu S. (2014). **Isolation and identification of a pathogenic *Plesiomonas shigelloides* from diseased grass carp.** *Wei Sheng Wu Xue Bao* 54:229–235.

Janda, J. M., Abbott, S. L., McIver, C. J. (2016). ***Plesiomonas shigelloides* revisited.** *Clinical microbiology reviews*, 29(2), 349-374.

Kunttu, H. M. T., Runtuvuori-Salmela, A., Middelboe, M., Clark, J., Sundberg, L. R. 2021. **Comparison of Delivery Methods in Phage Therapy against *Flavobacterium columnare* Infections in Rainbow Trout.** *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(8), 914. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080914>

Lamy, B., Baron, S., Barraud, O. 2022. **Aeromonas: the multifaceted middleman in the One Health world.** *Current opinion in microbiology*, 65, 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.09.012>

Larsen, A. M., Mohammed, H. H., Arias, C. R. (2014). **Characterization of the gut microbiota of three commercially valuable warmwater fish species.** *Journal of applied microbiology*, 116(6), 1396-1404.

Lomelí O. C. O., Martínez D. S. F. 2014. **Phage therapy against *Vibrio parahaemolyticus* infection in the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae.** *Aquaculture*, 434, 208-211. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.08.018>.

Makarov, R., Lomelí-Ortega, C. O., Zermeño C. L. A., García Á. E., Gutiérrez R. J. N., Cardona F. C. S., Martínez D. S. F. 2019. **Evaluation of a cocktail of phages for the control of presumptive *Vibrio parahaemolyticus* strains associated to acute hepatopancreatic necrosis disease.** *Aquaculture Research*. doi:10.1111/are.14258

Merabishvili, M., Pirnay, J. P., De Vos, D. 2018. **Guidelines to Compose an Ideal Bacteriophage Cocktail.** *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1693, 99–110. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7395-8_9.

Mohammed, H. H., Peatman, E. 2018. **Winter kill in intensively stocked channel catfish (*Ictalurus punctatus*): Coinfection with *Aeromonas veronii*, *Streptococcus parauberis* and *Shewanella putrefaciens*.** *Journal of fish diseases*, 41(9), 1339-1347. <https://doi.org/10.1111/jfd.12827>.

Murray, E., Draper, L. A., Ross, R. P., Hill, C. 2021. **The Advantages and Challenges of Using Endolysins in a Clinical Setting.** *Viruses*, 13(4), 680. <https://doi.org/10.3390/v13040680>

Nisha, R. G., Rajathi, V., Manikandan, R., Prabhu, N. M. (2014). **Isolation of *Plesiomonas shigelloides* from infected cichlid fishes using 16S rRNA**

characterization and its control with probiotic *Pseudomonas* sp. *Acta Scientiae Veterinariae*, 42(1), 1-7.

Pazda, M., Kumirska, J., Stepnowski, P., Mulkiewicz, E. 2019. **Antibiotic resistance genes identified in wastewater treatment plant systems—a review.** *Science of the Total Environment*, 697, 134023. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134023> .

Pereira, A. M. P. T., Silva, L. J. G., Meisel, L. M., Pena, A. 2015. **Fluoroquinolones and Tetracycline Antibiotics in a Portuguese Aquaculture System and Aquatic Surroundings: Occurrence and Environmental Impact.** *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 78(15), 959–975. <https://doi.org/10.1080/15287394.2015.103618> .

Pincinato, R. B., Asche, F., Bleie, H., Skrudland, A., Stormoen, M. 2021. **Factors influencing production loss in salmonid farming.** *Aquaculture*, 532, 736034. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736034>.

Pirnay, J. P., Ferry, T., Resch, G. 2022. **Recent progress toward the implementation of phage therapy in Western medicine.** *FEMS microbiology reviews*, 46(1). <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab040>.

Puneeth, T. G., Pallavi, B., Vilasini, U., Kushala, K. B., Nithin, M. S., Girisha, S. K., Suresh, T. 2022. **Large scale mortality in cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): natural co-infection with *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus iniae*.** *Iranian Journal of Veterinary Research*, 23(3), 219-228. <https://doi.org/10.22099/ijvr.2022.41796.6084>.

Rahman, M. U., Wang, W., Sun, Q., Shah, J. A., Li, C., Sun, Y., Li, Y., Zhang, B., Chen, W., Wang, S. 2021. **Endolysin, a Promising Solution against Antimicrobial Resistance.** *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(11), 1277. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10111277>

Ramos V.J., Superio, J., Galindo V.J., Acosta, F. 2021. **Phage Therapy as a Focused Management Strategy in Aquaculture**. *International journal of molecular sciences*, 22(19), 10436. <https://doi.org/10.3390/ijms221910436>.

Reygaert W. C. 2018. **An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria**. *AIMS microbiology*, 4(3), 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>

Rico, A., Satapornvanit, K., Haque, M. M., Min, J., Nguyen, P. T., Telfer, T. C., Van Den Brink, P. J. 2012. **Use of chemicals and biological products in Asian aquaculture and their potential environmental risks: a critical review**. *Reviews in Aquaculture*, 4(2), 75-93. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2012.01062.x>

Ruvalcaba, G. J. M., Villagrán Z., Valdez A. J. J., Martínez N. M., Gomez G., L. J., Ruesga G. E., Anaya E. L. M., Arteaga G. R. I., Villarruel L. A. 2022. **Non-Antibiotics Strategies to Control *Salmonella* Infection in Poultry**. *Animals*, 12(1), 102. <https://doi.org/10.3390/ani12010102>.

Ryan, L., Higgins, G., Doyle, M. 2017. ***Aeromonas* species endogenous endophthalmitis**. *JMM case reports*, 4(5), e005094. <https://doi.org/10.1099/jmmcr.0.005094>

Sarhan, W. A., Azzazy, H. M. 2015. **Phage approved in food, why not as a therapeutic?**. *Expert review of anti-infective therapy*, 13(1), 91-101. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.990383> .

Shayo, S. D., Mwita, C. J., Hosea, K. M. 2012. **Virulence of *Pseudomonas* and *Aeromonas* bacteria recovered from *Oreochromis niloticus* (Perege) from Mtera hydropower Dam; Tanzania**. *Annals of Biological Research*, 3(11), 5157-5161.

Silva, F. C. P., Brito, M. F. G., Farías, L. M., Nicoli, J. R. (2005). **Composition and antagonistic activity of the indigenous intestinal microbiota of *Prochilodus argenteus* Agassiz**. *Journal of fish biology*, 67(6), 1686-1698.

Silva, Y. J., C. Moreirinha, C. Pereira, L. Costa, Rocha R. J., Cunha A., Gomes N. C., Calado R., Almeida A. 2016. **Biological control of *Aeromonas salmonicida* infection in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*) with Phage AS-A.** *Aquaculture*, 450: 225–233 <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.025>

Sosa, H.J. E., Rodas Z.L. I., López P. I. Y., Melchor M.E. M., Aghalari Z., Limón D. S., Parra, S. R. 2021. **Sources of antibiotics pollutants in the aquatic environment under SARS-CoV-2 pandemic situation.** *Case studies in chemical and environmental engineering*, 4, 100127. <https://doi.org/10.1016/j.cscee.2021.100127>.

Stentiford, G.D., Bateman, I.J., Hinchliffe, S.J. 2020. **Sustainable aquaculture through the One Health lens.** *Nature Food* 1, 468–474. <https://doi.org/10.1038/s43016-020-0127-5>.

Sulumane Ramachandra, K. S., Dube, P. N., Pandikkadan Sundaran, S., Kalappurakkal Gopalan, M., Mangottil Ayyappan, P., Nandiath Karayi, S. 2021. **Coinfection with two strains of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* and *Vibrio harveyi* in cage farmed cobia, *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766).** *Aquaculture Research*, 52(4), 1525-1537. <https://doi.org/10.1111/are.15005>.

Ture, M., Cebeci, A., Altinok, I., Aygur, E., Caliskan, N. 2022. **Isolation and characterization of *Aeromonas hydrophila*-specific lytic bacteriophages.** *Aquaculture*, 738371. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738371>.

U.S. Government. 2017. Sec. 262 - **Regulation of biological products.** Disponible en: <https://www.govinfo.gov/content/pkg/USCODE-2017-title42/html/USCODE-2017-title42-chap6A-subchapII-partF-subpart1-sec262.htm>. (Accesada en Febrero de 2023).

Vikram, A., Callahan, M. T., Woolston, J. W., Sharma, M., Sulakvelidze, A. 2022. **Phage biocontrol for reducing bacterial foodborne pathogens in produce and**

other foods. *Current opinion in biotechnology*, 78, 102805.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102805>.

Wise, A. L., LaFrentz, B. R., Kelly, A. M., Khoo, L. H., Xu, T., Liles, M. R., Bruce, T. J. 2021. **A Review of Bacterial Co-Infections in Farmed Catfish: Components, Diagnostics, and Treatment Directions.** *Animals: an open access journal from MDPI*, 11(11), 3240. <https://doi.org/10.3390/ani11113240>

Wu, C. J., Ko, W. C., Lee, N. Y., Su, S. L., Li, C. W., Li, M. C., Chen, P. L. 2019. **Aeromonas isolates from fish and patients in Tainan City, Taiwan: Genotypic and phenotypic characteristics.** *Applied and environmental microbiology*, 85(21).
<https://doi.org/10.1128/AEM.01360-19>.

Xu, H., Zeng, Y. H., Yin, W. L., Lu, H. B., Gong, X. X., Zhang, N., Zhang, X., Long, H., Ren, W., Cai, X. N., Huang, A. Y., Xie, Z. Y. 2022. **Prevalence of Bacterial Coinfections with *Vibrio harveyi* in the Industrialized Flow-through Aquaculture Systems in Hainan Province: A Neglected High-Risk Lethal Causative Agent to Hybrid Grouper.** *International journal of molecular sciences*, 23(19), 11628.
<https://doi.org/10.3390/ijms231911628>.

Xu, Z., Jin, P., Zhou, X., Zhang, Y., Wang, Q., Liu, X., Shao, S., Liu, Q. 2021. **Isolation of a Virulent *Aeromonas salmonicida* subsp. *masoucida* Bacteriophage and Its Application in Phage Therapy in Turbot (*Scophthalmus maximus*).** *Applied and environmental microbiology*, 87(21), e0146821. <https://doi.org/10.1128/AEM.01468-21>

Yuwono, C., Wehrhahn, M. C., Liu, F., Riordan, S. M., Zhang, L. 2021. **The isolation of *Aeromonas* species and other common enteric bacterial pathogens from patients with gastroenteritis in an Australian population.** *Microorganisms*, 9(7).
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9071440> .

Zhang, J., Liu, X., Zhu, Y., Yang, L., Sun, L., Wei, R., Chen, G., Wang, Q., Sheng, J., Liu, A., Tao, F., Liu, K. 2020. **Antibiotic exposure across three generations from Chinese families and cumulative health risk**. *Ecotoxicology and environmental safety*, 191, 110237. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110237>

ANEXOS

ANEXO 1. ENCUESTAS PARA LA GRANJA ACUÍCOLA ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO *Aeromonas* spp.

A) ENCUESTA GENERAL PARA LA GRANJA ACUÍCOLA

Datos generales

Nombre de la granja: _____

Productor: _____ Identificación de granja CESAMICH: _____

Localidad: _____ Municipio: _____

Fecha: _____ Colector: _____

DATOS POBLACIONALES

Especie (s) que se cultiva(n): _____ Especie (s) que se
muestra: _____

Peso promedio: _____ Talla promedio: _____

Edad: _____ Densidad de animales: _____

Procedencia de crías: _____

Fecha de ultima introducción: _____ Estanque muestreado: _____

DATOS DE INSTALACIONES

Tipos de estanques: _____ Total de
estanques: _____ Frecuencia de limpieza de estanquería _____

Fuente de agua:

Manantial () Pozo () Arroyo () Río () Otra : _____

DATOS DE ALIMENTACIÓN

Frecuencia: _____ Cantidad de alimento: _____

Tipo de alimento: _____ Marca de alimento: _____

Fecha de elaboración: _____ Fecha de caducidad: _____

Lugar de almacenamiento _____

¿Es exclusivo para el alimento? Si () No ()

Suplementos: Vitaminas () Antibióticos () Otros: _____

¿Qué antibióticos? _____

SIGNOS

Fecha de reporte de signos o mortalidad: _____

COMPORTAMIENTO: Normal ()

Distribución en el cuerpo de agua:

Bordes () Afluyente () Otra: _____

NADO: Normal ()

En espiral () Errático () Superficie () Orilla () Otra: _____

ACTIVIDAD: Normal ()

Letárgico en: Fondo () Superficie () Orillas () Entrada de agua () Malla de los drenes () Boqueando () Frotándose () Movimientos espasmódicos () Señales de agotamiento () Otra: _____

MORTALIDAD: Ausencia ()

Presencia (): En masa () Acumulativa () Esporádica ()

Dato de mortalidad: _____

Huevos () Alevines () Crías () Juveniles () Sub-adultos ()
Reproductores ()

TIPOS DE ENFERMEDADES MÁS COMUNES EN LA GRANJA

Parásitos () Bacterias () Hongos () Nutricionales () Otras (cuáles) _____

¿Qué químicos o fármacos usa para el control de enfermedades?

¿Cuenta con baños en la granja? _____

¿Cuenta con agua en los baños? _____

¿Cuenta con jabón en los baños? _____

¿Cuenta con baños separados para mujeres y hombres? Si () No ()

¿limpia semanalmente los baños? Si () No ()

¿Tiene cuartos independientes para cambio de ropa? Si () No ()

¿Lavan o desinfectan el equipo a utilizar en la granja? Si () No ()

¿Existe un área de limpieza? Si () No ()

¿Conoce las Buenas prácticas de producción acuícola BPPA? Si () No ()

¿Implementa las BPPA? Si () No () Fecha de implementación de BPPA: _____

¿Cuenta con recipientes de basura? Si () No ()

¿Existen sistemas de desinfección en los accesos de la granja?:

Vados () Arcos de desinfección () Pediluvios ()

¿Existen fuentes de contaminación cerca de la granja?

Industrias () Poblaciones cercanas () Cultivos agrícolas () Ganado () Actividad forestal () Otros: _____

¿Existen plagas en la granja? No () Si () ¿de qué tipo?:

Cucarachas () Roedores () Mapache () Tejón () Nutria () Aves depredadoras () Ardilla () Otras: _____

¿Entierran los desechos de peces muertos y vísceras? Si () No () ¿Dónde? :

Dentro de la granja () Perímetro de la granja () Fuera de la granja ()

¿Usan cal? Si () No ()

¿Remueven los peces muertos o moribundos diariamente? Si () No ()

Usa alimento medicado para los peces: Si () No ()

Medicamento: _____

Presencia de animales domésticos:

Perros () Gatos () Gallinas () Vacas () Borregos () Caballos () Guajolotes () Puercos () Patos () Pájaros () Otros: _____

Presencia de animales silvestres en estanques:

Peces () Ranas () Tortugas () Víboras () Caracoles () Ajolotes () Otros:

Cuando recibe peces nuevos a la granja ¿lleva a cabo aclimatación?: Si () No ()

Cuarentena: Si () No () ¿Por cuánto tiempo?: _____

Muestras enviadas al laboratorio

Estadio	Cantidad	Enfermos	Sanos	Parámetros fisicoquímicos del estanque		
				T °C	Oxígeno disuelto	pH
Crías						
Juveniles						
Adultos						
Reproductores						

Observaciones

Observaciones	
----------------------	--

Toma de muestra

Representante de la granja

Toma de encuesta

Cargo:

Aislados

Aislados

B) ENCUESTA PARA EL TRABAJADOR DE LA GRANJA ACUÍCOLA

Nombre: _____

Horario de trabajo: _____

Edad: _____ ¿Desde cuándo labora en la granja? : _____

¿Cuenta con ropa y equipo exclusivo para el trabajo? Si () No () ¿Cuáles?:

Vestimenta impermeable () Botas () Mandiles () Guantes () Cubierta para la cabeza () Cubrebocas () Redes () Cubetas () Alimentadores ()

Otros _____

Frecuencia de aseo de ropa: _____

Higiene de manos:

Antes de entrar a la granja () Entre estanques () Antes de comer () Después de ir al baño () Al salir de la granja () Otra: _____

Lugar de consumo de alimentos:

Comedor () Otra: _____

¿Apoya en otra granja acuícola? Si () No () ¿En cuántas? _____

¿Cuáles? _____ ¿Algún familiar en casa trabaja en otra granja acuícola? Si () No ()

¿Se dedica usted a otra actividad?: Si () No () ¿Cuáles actividades, indique brevemente? _____

Presencia de animales domésticos en su casa: Si () No () ¿Cuáles?:

Perros () Gatos () Gallinas () Vacas () Borregos () Caballos () Guajolotes () Puercos () Patos () Pájaros () Otros: _____

¿Cuenta con agua entubada en su vivienda? Si () No () Otra: _____
Frecuencia de baño: _____

Respecto a la instalación sanitaria en casa, cuenta con:

Baño () Fosa séptica () Otra: _____

Salud

¿Ha presentado recientemente problemas estomacales? : Si () No () ¿Algún familiar en su casa?: Si () No ()

Frecuencia: _____

Otros padecimientos de salud:

ANEXO 2

FACTORES ASOCIADOS A LA PRESENCIA DE <i>Aeromonas</i> SPP. EN LAS GRANJAS TRUTÍCOLAS FACTORES NEUTROS DE LA GRANJA						
Exposición	Riesgo relativo (IC 95%)	Razón de productos cruzados (IC 95%)	Prueba Chi cuadrada Mantel Haenszel	Prueba bilateral Mantel Haenszel	Fisher exact	Prueba bilateral Fisher exact
POLICULTIVO						
Cultiva otra especie piscícola en la granja	2.01 (0.64-6.34)	4.10 (0.68-24.43)	2.67*	0.10*	0.52-48-01	0.17
Cultiva carpa herbívora en la granja	1.96 (0.39-9.84)	3.80 (0.32-44.49)	1.27*	0.25*	0.18-230.23	0.29
Cultiva tilapia en la granja	1.96 (0.39-9.84)	3.80 (0.32-44.49)	1.27*	0.25*	0.18-230.23	0.29
MONOCULTIVO						
Cultiva exclusivamente trucha en la granja	0.49 (0.15-1.55)	0.24 (0.04-1.44)	2.67*	0.10*	0.02-1.91	0.17
Hay estanques	1.57 (1.30-1.89)	6.33 (0.0096-4189)	0.56*	0.45*	0.01-idefinido	1
PROCEDIMIENTOS DE BIOSEGURIDAD						
Limpia los estanques cada 6 meses	2.01 (0.64-6.34)	4.10 (0.68-24.43)	2.67*	0.10*	0.52-48.01	0.17
Limpia los estanques cada 15 días	1.48 (0.83-2.63)	2.59 (0.79-8.45)	2.53	0.11		
No existen sistemas de desinfección en los accesos de la granja	1.34 (0.90-2.01)	2.25 (0.79-6.38)	2.34	0.12		
Limpia los estanques cada semana	1.17 (0.63-2.17)	1.51 (0.36-6.31)	0.32*	0.56*	0.26-7.94	0.71
Lavan o desinfectan el equipo a utilizar en la granja	0.74 (0.40-1.34)	0.48 (0.13-1.73)	1.24*	0.26*	0.11-2.13	0.32
Limpia a la semana frecuentemente los estanques	0.73 (0.52-1.04)	0.39 (0.12-1.26)	2.50	0.11		
Existen sistemas de desinfección en los accesos de la granja	0.71 (0.47-1.07)	0.39 (0.14-1.13)	2.97	0.08		

Hay pediluvios en los accesos de la granja	0.71 (0.47-1.07)	0.39 (0.14-1.13)	2.97	0.08		
Limpia los estanques cada tercer día	0.67 (0.49-0.92)	0.18 (0.02-1.60)	2.75*	0.09*	0.004-1.60	0.13
Usan cal	0.66 (0.40-1.07)	0.35 (0.11-1.04)	3.61	0.05		
MANEJOS DE DESECHOS						
No entierra los desechos de peces muertos y vísceras	1.83 (0.90-3.73)	3.84 (1.07-13.66)	4.57*	0.03*	0.91-17.17	0.050
Baños separados para hombres y mujeres	1.48 (0.83-2.63)	2.59 (0.79-8.45)	2.53	0.11		
No cuenta con baños en la granja	1.30 (0.81-2.09)	1.99 (0.66-5.98)	1.50	0.21		
COMPORTAMIENTO DE LOS PECES						
Los peces han presentado comportamiento normal	1.18 (0.65-2.15)	1.73 (0.17-17.73)	0.21*	0.64*	0.12-95.26	1
Los peces han presentado distribución en el afluente	1.29 (0.31-5.22)	1.81 (0.10-30.51)	0.17*	0.67*	0.02-146.22	1
Presentan un nado en la superficie	1.29 (0.31-5.22)	1.81 (0.10-30.51)	0.17*	0.67*	0.02-146.22	1
Presentan actividad normal	1.34 (0.89-2.02)	3.05 (0.33-27.89)	1.05	0.30	0.30-150.97	0.40
Presenta una actividad en el fondo y en las orillas	1.29 (0.31-5.22)	1.81 (0.10-30.51)	0.17*	0.67*	0.02-146.22	1
ANIMALES SILVESTRES						
Existe presencia de ajolotes	1.96 (0.39-9.84)	3.80 (0.32-44.49)	1.27*	0.25*	0.18-230.23	0.29
Existe la presencia de ranas y caracoles	1.30 (0.47-3.52)	1.85 (0.24-14.14)	0.36*	0.54*	0.12-27.06	0.61
Existen mapaches y tejones	1.29 (0.31-5.22)	1.81 (0.10-30.51)	0.17*	0.67*	0.02-146.22	1
Existe presencia de víboras	0.76 (0.52-1.11)	0.39 (0.007-2.03)	1.28*	0.25*	0.03-2.27	0.30
ÁREA ALEDAÑA						

Existen industrias cerca de la granja	1.29 (0.31-5.22)	1.81 (0.10-30.51)	0.17*	0.67*	0.02-146.22	1
NATURALEZA DE LA ENFERMEDAD						
No se han presentado enfermedades en la granja	1.30 (0.81-2.09)	1.99 (0.66-5.98)	1.50	0.21	0.57-6.84	0.26
La enfermedad presentada es ocasionada por bacterias y hongos	1.29 (0.31-5.22)	1.81 (0.10-30.51)	0.17*	0.67*	0.02-146.22	1
ALIMENTO						
Suministra alimento de la marca Cleyton	1.30 (0.47-3.52)	1.85 (0.24-14.14)	0.36*	0.54*	0.12-27.06	0.61
ANIMALES DOMÉSTICOS						
Tienen perros, gallinas, vacas y guajolotes	1.29 (0.31-5.22)	1.81 (0.10-30.51)	0.17*	0.67*	0.02-146.22	1
Tiene perros y vacas	1.29 (0.31-5.22)	1.81 (0.10-30.51)	0.17*	0.67*	0.02-146.22	1
SUSTANCIAS QUÍMICAS Y FÁRMACOS						
No usa químicos y fármacos para el control de enfermedades	1.23 (0.79-1.93)	1.75 (0.59-5.19)	1.02	0.31		
ABASTECIMIENTO DE AGUA						
La fuente de agua es un río	1.23 (0.72-2.12)	1.71 (0.49-5.90)	0.72*	0.39*	0.40-6.99	0.51
MORTALIDAD						
No han presentado mortalidad	1.18 (0.82-1.69)	1.63 (0.52-5.04)	0.72	0.39		
Presenta mortalidad acumulativa	0.74 (0.49-1.12)	0.32 (0.03-2.98)	1.05*	0.30*	0.006-3.25	0.40

FACTORES ASOCIADOS A LA PRESENCIA DE <i>Aeromonas</i> SPP. EN LAS GRANJAS TRUTÍCOLAS FACTORES NEUTROS DEL TRABAJADOR						
Exposición	Riesgo relativo (IC 95%)	Razón de productos cruzados (IC 95%)	Prueba Chi cuadrada Mantel Haenszel	Prueba bilateral Mantel Haenszel	Fisher exact	Prueba bilateral Fisher exact
ANIMALES DOMÉSTICOS EN CASA						
Tiene cerdos	2.66 (0.48-14.69)	6 (0.58-61.42)	2.78*	0.09*	0.43-322	0.12
Tiene guajolotes	1.34 (0.74-2.44)	2.05(0.57-7.34)	1.24*	0.26*	0.46-8.9	0.32
Tiene borregos	1.32 (0.64-2.70)	1.94 (0.43-8.66)	0.77*	0.37*	0.32-11.59	0.44
Tiene animales domésticos en su hogar	1.20 (0.76-1.87)	1.80 (0.33-9.7)	0.46*	0.49*	0.28-19.65	0.70
Tiene gatos	1.18 (0.73-1.90)	1.55 (0.48-4.9)	0.55	0.45		
Tiene vacas	0.69 (0.50-0.96)	0.25 (0.05-1.29)	2.94*	0.08*	0.02-1.40	0.11
PROBLEMAS DE SALUD						
Familiar con problemas estomacales	1.96 (0.39-9.84)	3.80 (0.32-44.49)	1.27*	0.25*	0.18-230.23	0.29
Presenta incontinencia urinaria	1.96 (0.39-9.84)	3.80 (0.32-44.49)	1.27*	0.25*	0.18-230.23	0.29
Presencia de problemas estomacales recientemente	1.65 (0.55-4.9)	2.92 (0.45-18.95)	1.34*	0.24*	0.30-37.01	0.34
Presenta algún padecimiento de salud	1.32 (0.64-2.70)	1.94 (0.43-8.66)	0.77*	0.37*	0.32-11.59	0.44
OTRAS ACTIVIDADES QUE REALIZA						
Se dedica alguna actividad forestal	1.65 (0.55-4.9)	2.92 (0.45-18.95)	1.34*	0.24*	0.30-37.01	0.34
Se dedica al comercio	1.29 (0.31-5.22)	1.81 (0.10-30.51)	0.17*	0.67*	0.02-146.22	1
VIVIENDA						
Cuenta con comedor	1.26 (0.85-1.88)	1.89 (0.67-5.3)	1.44	0.22		
Cuenta con un lugar para consumo de alimentos	1.26 (0.85-1.88)	1.89 (0.67-5.3)	1.44	0.22		
EQUIPO EXCLUSIVO PARA EL TRABAJO						
Cuenta con guantes	1.21 (0.76-1.92)	1.65 (0.54-5.04)	0.77	0.37		
Cuenta con ropa y equipo	0.58 (0.26-1.27)	0.30 (0.07-1.22)	2.93*	0.08*	0.05-1.51	0.14

exclusivo para el trabajo						
Algún familiar trabaja en otra granja acuícola	1.31 (0.57-2.98)	1.90 (0.35-10.29)	0.55*	0.45*	0.23-15.37	0.65
HIGIENE						
Lava sus manos antes de entrar a la granja	0.70 (0.43-1.14)	0.41 (0.14-1.24)	2.45	0.11		
Lava sus manos al salir de la granja	0.67 (0.37-1.19)	0.38 (0.11-1.25)	2.53	0.11		
Lava sus manos diario	0.48 (0.18-1.23)	0.22 (0.04-1)	4.22*	0.03*	0.03-1.22	0.059

*Variables donde X^2 no son válidos se indican de acuerdo a EPI INFO

ANEXO 3 Evaluación de las granjas en BPPA		GRANJA TRUTÍCOLA																								
Reactivos		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1	¿Limpia frecuentemente a la semana los estanques?	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	¿Se proporciona alimento balanceado?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	¿Tiene bodega exclusiva para almacenar el alimento de los peces?	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
4	¿Proporciona alguna vitamina?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
5	¿Proporciona algún suplemento?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	¿Proporciona fármacos y sustancias químicas aprobados por la FDA?	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0
7	¿Proporciona productos de baja prioridad regulatoria?	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
8	¿Ausencia de signos de enfermedad?	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1
9	¿Se ha presentado comportamiento normal?	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
10	¿Presentan nado normal?	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
11	¿Presentan actividad normal?	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	¿Ausencia de mortalidad?	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
13	¿Ausencia de algún tipo de enfermedad en la granja?	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
14	¿Cuenta con baños en la granja?	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
15	¿Tiene cuartos independientes para cambio de ropa?	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1
16	¿Lavan o desinfectan el equipo a utilizarlo en la granja?	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
17	¿Existe un área de limpieza?	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1
18	¿Conoce las buenas prácticas de producción acuícola BPPA?	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1
19	¿Implementa las BPPA?	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
20	¿Cuenta con recipientes de basura?	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1

21	¿Existen sistemas de desinfección en los accesos de la granja?	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1
22	¿Existen plagas en la granja?	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
23	¿Entierra los desechos de los peces muertos y vísceras?	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1
24	¿Usan cal?	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0
25	¿Remueven los peces muertos o moribundos diariamente?	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1
26	¿Ausencia de uso de alimento medicado para los peces?	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1
27	¿Animales domésticos aislados del sistema piscícola?	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
28	¿Presencia de animales silvestres en los estanques?	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0
29	¿Lleva acabo aclimatación de los peces nuevos en la granja?	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1
30	¿Lleva acabo el procedimiento de cuarentena para los peces?	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1
31	Temperatura	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
32	pH	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
33	Oxígeno disuelto	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Suma	19	20	15	20	23	25	21	25	26	15	15	15	14	19	14	19	23	15	19	19	13	19	15	23
	Grado de cumplimiento (%)	58	61	45	61	70	76	64	76	79	45	45	45	42	58	42	58	70	45	58	58	39	58	45	70
	Aprobación : Aprobado (A), No aprobado (NA)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

		GRANJA TRUTÍCOLA																											
Reactivos		26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50			
1	¿Limpia frecuentemente a la semana los estanques?	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0			

2	¿Se proporciona alimento balanceado?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	¿Tiene bodega exclusiva para almacenar el alimento de los peces?	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
4	¿Proporciona alguna vitamina?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	¿Proporciona algún suplemento?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	¿Proporciona fármacos y sustancias químicas aprobados por la FDA ?	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	¿Proporciona productos de baja prioridad regulatoria?	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
8	¿Ausencia de signos de enfermedad?	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	¿Se ha presentado comportamiento normal?	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	¿Presentan nado normal?	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
11	¿Presentan actividad normal?	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	¿Ausencia de mortalidad?	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
13	¿Ausencia de algún tipo de enfermedad en la granja?	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
14	¿Cuenta con baños en la granja?	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
15	¿Tiene cuartos independientes para cambio de ropa?	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0
16	¿Lavan o desinfectan el equipo a utilizarlo en la granja?	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
17	¿Existe una área de limpieza?	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1
18	¿Conoce las buenas prácticas de producción acuícola BPPA?	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
19	¿Implementa las BPPA?	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
20	¿Cuenta con recipientes de basura?	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1
21	¿Existen sistemas de desinfección en los accesos de la granja?	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1
22	¿Existen plagas en la granja?	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1
23	¿Entierra los desechos de los peces muertos y vísceras?	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
24	¿Usan cal?	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
25	¿Remueven los peces muertos o moribundos diariamente?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
26	¿Ausencia de uso de alimento medicado para los peces?	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1

27	¿Animales domésticos aislados del sistema piscícola?	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
28	¿Presencia de animales silvestres en los estanques?	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1
29	¿Lleva acabo aclimatación de los peces nuevos en la granja?	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0
30	¿Lleva acabo el procedimiento de cuarentena para los peces?	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
31	Temperatura	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1
32	pH	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1
33	Oxígeno disuelto	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1
	Suma	21	19	22	12	21	18	11	13	17	25	14	26	23	21	23	17	21	24	24	15	23	26	25	27	26
	Grado de cumplimiento (%)	64	58	67	36	64	55	33	39	52	76	42	79	70	64	70	52	64	73	73	45	70	79	76	82	79
	Aprobación : Aprobado (A), No aprobado (NA)	NA	NA	N A	N A	N A	N A	N A	N A	N A	N A	N A	N A	N A	N A	N A	N A	N A	N A	N A	N A	N A	N A	N A	A	N A

		GRANJA TRUTÍCOLA															
Reactivos		51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64		
1	¿Limpia frecuentemente a la semana los estanques?	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0		
2	¿Se proporciona alimento balanceado?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
3	¿Tiene bodega exclusiva para almacenar el alimento de los peces?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0		
4	¿Proporciona alguna vitamina?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
5	¿Proporciona algún suplemento?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
6	¿Proporciona fármacos y sustancias químicas aprobados por la FDA?	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0		
7	¿Proporciona productos de baja prioridad regulatoria?	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1		
8	¿Ausencia de signos de enfermedad?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0		
9	¿Se ha presentado comportamiento normal?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
10	¿Presentan nado normal?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		

11	¿Presentan actividad normal?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	¿Ausencia de mortalidad?	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
13	¿Ausencia de algún tipo de enfermedad en la granja?	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
14	¿Cuenta con baños en la granja?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
15	¿Tiene cuartos independientes para cambio de ropa?	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0
16	¿Lavan o desinfectan el equipo a utilizarlo en la granja?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
17	¿Existe una área de limpieza?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0
18	¿Conoce las buenas prácticas de producción acuícola BPPA?	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
19	¿Implementa las BPPA?	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1
20	¿Cuenta con recipientes de basura?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
21	¿Existen sistemas de desinfección en los accesos de la granja?	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0
22	¿Existen plagas en la granja?	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0
23	¿Entierra los desechos de los peces muertos y vísceras?	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1
24	¿Usan cal?	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0
25	¿Remueven los peces muertos o moribundos diariamente?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
26	¿Ausencia de uso de alimento medicado para los peces?	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
27	¿Animales domésticos aislados del sistema piscícola?	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1
28	¿Presencia de animales silvestres en los estanques?	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0
29	¿Lleva acabo aclimatación de los peces nuevos en la granja?	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
30	¿Lleva acabo el procedimiento de cuarentena para los peces?	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
31	Temperatura	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1
32	pH	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1
33	Oxígeno disuelto	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Suma	22	24	22	26	25	23	25	24	18	18	22	15	23	15
	Grado de cumplimiento (%)	67	73	67	79	76	70	76	73	55	55	67	45	70	45
	Aprobación : Aprobado (A), No aprobado (NA)	NA	N A	N A	NA	NA	N A	N A	N A	N A	N A	N A	NA	NA	NA

ANEXO 4. PERFILES DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA		ESPECIE	TRUCHA DORADA (<i>Oncorhynchus chrysogaster</i>)			
		AISLAMIENTOS	X6	R6	P6	Q6
		ESPECIE BACTERIANA	<i>Aeromonas bestiarum</i>	<i>Aeromonas sobria</i>	<i>Aeromonas bestiarum</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
Clase de antibiótico	Agente antimicrobiano	Abreviación y contenido del disco (µg)	Criterio Interpretativo del diámetro de sensibilidad			
Penicilinas y combinaciones de betalactámicos / inhibidores de betalactamasas						
	Amoxicilina-ácido clavulánico	AMC 20/10	R	R	R	I
	Ampicilina-sulbactam	SAM 10/10	R	R	R	S
	Piperacilina-Tazobactam	TZP 100/10	R	I	R	S
Cefalosporinas						
	Cefazolina	KZ 30	R	R	R	R
	Cefepima	FEP 30	S	S	S	S
	Cefotaxima	CTX 30	S	S	S	R
	Cefoxitina	FOX 30	R	R	R	S
	Ceftazidima	CAZ 30	S	S	S	I
	Ceftriaxona	CRO 30	S	S	S	S

	Cefuroxima sódica (parenteral)	CXM 30	S	S	S	S
Carbapenems						
	Ertapanem	ETP 10	R	R	R	S
	Imipenem	IPM 10	R	R	R	I
	Meropenem	MEM 10	R	R	R	R
Monobactámicos						
	Aztreonam	AZT30	S	S	S	S
Aminoglucósidos						
	Amikacina	AK 30	S	S	I	R
	Gentamicina	CN 10	S	I	I	R
Tetraciclinas						
	Tetraciclina	TE 30	S	S	S	S
Quinolonas						
	Ciprofloxacina	CIP 5	S	S	S	I
	Levofloxacina	LEV 5	S	S	S	S
Inhibidores de la ruta de folato						
	Sulfametoxazol-trimetoprim	SXT 1.25/23.75	S	S	S	S
Anfenicoles						
	Cloranfenicol	C 30	S	S	S	S

PERFILES DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA		ESPECIE	TRUCHA ARCO IRIS (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)					
		AISLAMIENTOS	P1	C	N1	B	M	D
		ESPECIE BACTERIANA	<i>Aeromonas bestiarum</i>	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	<i>Aeromonas rivipollensis</i>	<i>Aeromonas sobria</i>
Clase de antibiótico	Agente antimicrobiano	Abreviación y contenido del disco (µg)	Criterio Interpretativo del diámetro de sensibilidad					
Penicilinas y combinaciones de betalactámicos / inhibidores de betalactamasas								
	Amoxicilina-ácido clavulánico	AMC 20/10	S	I	I	R	R	I
	Ampicilina-sulbactam	SAM 10/10	R	S	R	R	R	R
	Piperacilina-Tazobactam	TZP 100/10	R	S	S	I	S	S
Cefalosporinas								
	Cefazolina	KZ 30	R	S	S	R	R	S
	Cefepima	FEP 30	I	R	S	I	I	S
	Cefotaxima	CTX 30	I	R	S	I	S	S
	Cefoxitina	FOX 30	S	I	S	R	S	I
	Ceftazidima	CAZ 30	S	R	S	R	S	S

	Ceftriaxona	CRO 30	S	R	S	S	S	R
	Cefuroxima sódica (parenteral)	CXM 30	S	R	S	S	S	S
Carbapenems								
	Ertapanem	ETP 10	I	S	S	R	S	S
	Imipenem	IPM 10	R	S	I	R	S	I
	Meropenem	MEM 10	I	S	S	I	S	S
Monobactámicos								
	Aztreonam	AZT30	S	R	S	S	S	S
Aminoglucósidos								
	Amikacina	AK 30	S	I	S	I	S	S
	Gentamicina	CN 10	S	S	I	I	S	S
Tetraciclinas								
	Tetraciclina	TE 30	S	S	S	R	S	S
Quinolonas								
	Ciprofloxacina	CIP 5	S	S	S	S	S	S
	Levofloxacina	LEV 5	S	S	S	S	S	S
Inhibidores de la ruta de folato								
	Sulfametoxazol- trimetoprima	SXT 1.25/23.75	S	S	S	S	S	S
Anfenicoles								
	Cloranfenicol	C 30	S	S	S	S	S	S

PERFILES DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA		ESPECIE	TRUCHA ARCO IRIS (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)					
		AISLAMIENTOS	S1	36	S	30	0	U
		ESPECIE BACTERIANA	<i>Aeromonas rivipollensis</i>	<i>Aeromonas sobria</i>	<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	<i>Aeromonas rivipollensis</i>	<i>Aeromonas sobria</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
Clase de antibiotico	Agente antimicrobiano	Abreviación y contenido del disco (µg)	Criterio Interpretativo del diámetro de sensibilidad					
Penicilinas y combinaciones de betalactámicos / inhibidores de betalactamasas								
	Amoxicilina-ácido clavulánico	AMC 20/10	R	R	R	R	R	R
	Ampicilina-sulbactam	SAM 10/10	R	R	R	R	R	R
	Piperacilina-Tazobactam	TZP 100/10	S	S	R	R	R	I
Cefalosporinas								
	Cefazolina	KZ 30	R	R	R	R	R	R
	Cefepima	FEP 30	S	S	S	I	R	R
	Cefotaxima	CTX 30	S	S	I	S	R	R
	Cefoxitina	FOX 30	S	R	S	I	R	R
	Ceftazidima	CAZ 30	S	I	S	R	S	R

	Ceftriaxona	CRO 30	S	S	S	S	R	R
	Cefuroxima sódica (parenteral)	CXM 30	S	S	S	S	R	R
Carbapenems								
	Ertapanem	ETP 10	S	S	R	R	R	R
	Imipenem	IPM 10	S	S	R	R	R	R
	Meropenem	MEM 10	S	S	R	R	R	R
Monobactámicos								
	Aztreonam	AZT30	S	S	S	S	R	R
Aminoglucósidos								
	Amikacina	AK 30	S	I	R	S	R	S
	Gentamicina	CN 10	S	S	R	S	I	S
Tetraciclinas								
	Tetraciclina	TE 30	S	S	R	S	I	S
Quinolonas								
	Ciprofloxacina	CIP 5	S	S	S	S	S	I
	Levofloxacina	LEV 5	S	S	S	S	S	I
Inhibidores de la ruta de folato								
	Sulfametoxazol- trimetoprima	SXT 1.25/23.75	R	S	S	S	S	R
Anfenicóles								
	Cloranfenicol	C 30	S	S	S	S	R	R

PERFILES DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA		ESPECIE	TRUCHA ARCO IRIS (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)					
		AISLAMIENTOS	Z1B	59	60	F1	G1	13
		ESPECIE BACTERIANA	<i>Aeromonas sobria</i>	<i>Serratia fonticola</i>	<i>Aeromonas rivipollensis</i>	<i>Aeromonas sp.</i>	<i>Aeromonas rivipollensis</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
Clase de antibiótico	Agente antimicrobiano	Abreviación y contenido del disco (µg)	Criterio Interpretativo del diámetro de sensibilidad					
Penicilinas y combinaciones de betalactámicos / inhibidores de betalactamasas								
	Amoxicilina-ácido clavulánico	AMC 20/10	R	R	R	R	R	R
	Ampicilina-sulbactam	SAM 10/10	R	R	R	R	R	R
	Piperacilina-Tazobactam	TZP 100/10	R	R	R	R	R	R
Cefalosporinas								
	Cefazolina	KZ 30	R	R	R	R	R	R
	Cefepima	FEP 30	R	I	I	R	I	S
	Cefotaxima	CTX 30	R	S	R	R	I	S
	Cefoxitina	FOX 30	I	R	I	R	S	S
	Ceftazidima	CAZ 30	R	S	R	R	I	S

	Ceftriaxona	CRO 30	R	I	I	I	S	S
	Cefuroxima sódica (parenteral)	CXM 30	R	S	R	R	I	S
Carbapenems								
	Ertapanem	ETP 10	R	R	I	R	I	R
	Imipenem	IPM 10	R	R	S	S	R	R
	Meropenem	MEM 10	R	R	I	R	I	R
Monobactámicos								
	Aztreonam	AZT30	R	S	S	I	S	S
Aminoglucósidos								
	Amikacina	AK 30	R	R	S	R	R	S
	Gentamicina	CN 10	R	R	R	R	R	S
Tetraciclinas								
	Tetraciclina	TE 30	R	R	R	R	S	S
Quinolonas								
	Ciprofloxacina	CIP 5	R	R	S	I	S	S
	Levofloxacina	LEV 5	R	I	S	S	S	S
Inhibidores de la ruta de folato								
	Sulfametoxazol- trimetoprima	SXT 1.25/23.75	R	I	S	I	S	S
Anfenicoles								
	Cloranfenicol	C 30	S	I	S	S	S	S

PERFILES DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA		ESPECIE	TRUCHA ARCO IRIS (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)					
		AISLAMIENTOS	O6	61	M6	A2	68	E5
		ESPECIE BACTERIANA	<i>Aeromonas sobria</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>ranae</i>	<i>Aeromonas aquatica</i>	<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	<i>Aeromonas allosaccharophila</i>
Clase de antibiótico	Agente antimicrobiano	Abreviación y contenido del disco (µg)	Criterio Interpretativo del diámetro de sensibilidad					
Penicilinas y combinaciones de betalactámicos / inhibidores de betalactamasas								
	Amoxicilina-ácido clavulánico	AMC 20/10	I	R	R	S	R	I
	Ampicilina-sulbactam	SAM 10/10	R	R	R	R	R	R
	Piperacilina-Tazobactam	TZP 100/10	S	S	R	I	I	R
Cefalosporinas								
	Cefazolina	KZ 30	S	R	R	R	R	I
	Cefepima	FEP 30	S	R	S	S	S	S
	Cefotaxima	CTX 30	S	R	S	S	S	S

	Cefoxitina	FOX 30	S	R	R	S	S	S
	Ceftazidima	CAZ 30	S	R	S	S	S	S
	Ceftriaxona	CRO 30	S	R	S	S	S	S
	Cefuroxima sódica (parenteral)	CXM 30	S	R	S	S	S	S
Carbapenems								
	Ertapanem	ETP 10	S	R	R	S	I	R
	Imipenem	IPM 10	I	R	R	S	R	R
	Meropenem	MEM 10	S	R	R	S	I	R
Monobactámicos								
	Aztreonam	AZT30	S	R	S	S	S	S
Aminoglucósidos								
	Amikacina	AK 30	I	S	S	S	R	R
	Gentamicina	CN 10	I	S	S	S	I	R
Tetraciclinas								
	Tetraciclina	TE 30	S	S	S	S	I	S
Quinolonas								
	Ciprofloxacina	CIP 5	S	S	S	S	S	S
	Levofloxacina	LEV 5	S	S	S	S	S	S
Inhibidores de la ruta de folato								
	Sulfametoxazol- trimetoprima	SXT 1.25/23.75	S	R	S	S	S	S
Anfenicoles								
	Cloranfenicol	C 30	S	R	S	S	S	S

PERFILES DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA		ESPECIE	TRUCHA ARCO IRIS (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)					
		AISLAMIENTOS	D2	G2	71b	T2	Ñ2	O2
		ESPECIE BACTERIANA	<i>Aeromonas media</i>	<i>Aeromonas sobria</i>	<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	<i>Aeromonas sobria</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
Clase de antibiótico	Agente antimicrobiano	Abreviación y contenido del disco (µg)	Criterio Interpretativo del diámetro de sensibilidad					
Penicilinas y combinaciones de betalactámicos / inhibidores de betalactamasas								
	Amoxicilina-ácido clavulánico	AMC 20/10	R	I	R	I	R	R
	Ampicilina-sulbactam	SAM 10/10	R	R	R	R	R	R
	Piperacilina-Tazobactam	TZP 100/10	R	S	R	S	R	I
Cefalosporinas								
	Cefazolina	KZ 30	R	S	R	S	R	R
	Cefepima	FEP 30	S	S	S	S	S	S
	Cefotaxima	CTX 30	I	I	S	S	I	R
	Cefoxitina	FOX 30	R	S	S	S	S	S
	Ceftazidima	CAZ 30	S	S	S	S	S	S
	Ceftriaxona	CRO 30	S	S	S	S	S	I

	Cefuroxima sódica (parenteral)	CXM 30	R	S	S	S	S	S
Carbapenems								
	Ertapanem	ETP 10	I	I	R	S	R	R
	Imipenem	IPM 10	S	R	R	I	R	I
	Meropenem	MEM 10	I	I	R	S	R	I
Monobactámicos								
	Aztreonam	AZT30	S	S	S	S	S	R
Aminoglucósidos								
	Amikacina	AK 30	I	I	R	R	R	R
	Gentamicina	CN 10	I	I	I	I	R	I
Tetraciclinas								
	Tetraciclina	TE 30	S	I	S	I	I	S
Quinolonas								
	Ciprofloxacina	CIP 5	S	S	S	S	S	S
	Levofloxacina	LEV 5	S	S	S	S	S	S
Inhibidores de la ruta de folato								
	Sulfametoxazol- trimetoprima	SXT 1.25/23.75	S	S	S	S	S	R
Anfenicoles								
	Cloranfenicol	C 30	S	S	S	S	S	S

PERFILES DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA		ESPECIE	TRUCHA ARCO IRIS (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)					
		AISLAMIENTOS	L	E	ZA	J1	U2	A3
		ESPECIE BACTERIANA	<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	<i>Aeromonas sobria</i>	<i>Aeromonas finlandiensis</i>	<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	<i>Aeromonas sobria</i>
Clase de antibiótico	Agente antimicrobiano	Abreviación y contenido del disco (µg)	Criterio Interpretativo del diámetro de sensibilidad					
Penicilinas y combinaciones de betalactámicos / inhibidores de betalactamasas								
	Amoxicilina-ácido clavulánico	AMC 20/10	R	I	R	R	R	R
	Ampicilina-sulbactam	SAM 10/10	R	R	R	R	R	R
	Piperacilina-Tazobactam	TZP 100/10	R	S	R	R	R	R
Cefalosporinas								
	Cefazolina	KZ 30	R	R	I	R	R	R
	Cefepima	FEP 30	S	S	S	S	R	I
	Cefotaxima	CTX 30	S	S	S	I	R	S
	Cefoxitina	FOX 30	I	S	S	S	S	S

	Ceftazidima	CAZ 30	S	S	S	I	R	S
	Ceftriaxona	CRO 30	S	S	S	S	R	S
	Cefuroxima sódica (parenteral)	CXM 30	S	S	S	S	R	S
Carbapenems								
	Ertapanem	ETP 10	R	S	R	S	R	R
	Imipenem	IPM 10	R	S	R	I	I	R
	Meropenem	MEM 10	R	S	R	I	R	R
Monobactámicos								
	Aztreonam	AZT30	S	S	S	S	R	S
Aminoglucósidos								
	Amikacina	AK 30	R	R	I	I	R	R
	Gentamicina	CN 10	R	R	I	I	R	R
Tetraciclinas								
	Tetraciclina	TE 30	S	S	S	S	R	R
Quinolonas								
	Ciprofloxacina	CIP 5	I	S	I	S	R	R
	Levofloxacina	LEV 5	I	S	S	S	I	I
Inhibidores de la ruta de folato								
	Sulfametoxazol -trimetoprima	SXT 1.25/23.75	S	S	I	S	R	S
Anfenicóles								
	Cloranfenicol	C 30	S	S	S	S	S	S

ANEXO 5. ANÁLISIS DE COSTOS PARA EL ESTABLECIMIENTO DE LA FAGOTERAPIA

1) ANÁLISIS COMPARATIVO DEL COSTO DE LA FAGOTERAPIA Y LA ANTIBIOTERAPIA

Debido a que fue factible el aislamiento de los bacteriófagos candidatos para el biocontrol de bacterias procedentes de la piscicultura, se realizó la estimación de su costo para su aplicación en granjas piscícolas. Para lo cual se realizó el análisis del material de laboratorio necesario para llevar a cabo la amplificación de los bacteriófagos terapéuticos y contar con el volumen necesario para su administración en el agua. Este análisis se realizó considerando los precios de insumos al 22-11-2022. Brevemente se consideró un estanque de 18m³ con 4000 truchas de 100 g cada una y respecto al volumen de la suspensión de los bacteriófagos para aplicar se tomó de referencia la investigación de Imbeault *et al.*, (2006), quienes administraron 100 ml de la solución de bacteriófagos para un acuario de 70 litros y proporcionaron dos aplicaciones a concentraciones de 10⁹- 10¹⁰ UFP/ml. Se consideró concentrar la suspensión de los bacteriófagos a 10x, por lo que se necesitan 2.57 litros por aplicación en el estanque de 18 m³ y dos aplicaciones por tratamiento de fagoterapia resultó un total de \$1882 por el tratamiento de un estanque (Tabla 10). Asimismo, para comparar los costos de la fagoterapia vs terapia antibiótica se hizo la estimación considerando la administración de la Gentamicina, el cual es uno de los principales antibióticos de elección para el tratamiento de infecciones por *Aeromonas* spp. en las granjas piscícolas. Para la tasa de alimentación de los organismos se tomó el 8% de su biomasa y se consideró agregar el antibiótico en el alimento con una aplicación de 8 ml/ kg de alimento por 5 días. Por lo cual se necesitan 3 frascos del antibiótico con 500 ml cada uno, con un costo total de \$1800.

En conclusión la estimación de los costos de ambas terapias son similares. Como se mencionó anteriormente la fagoterapia representa numerosas ventajas ambientales y

terapéuticas en comparación al uso de antibióticos, no obstante es necesario realizar la evaluación *in vivo* para determinar el costo exacto de la fagoterapia por estanque.

Tabla 1. Descripción de cotización

Descripción	Cantidad	Costo
*Caldo TSA (2X)	1 litro	\$152.72
Material de laboratorio general (filtros, cajas de petri, jeringa, puntas, cloroformo, guantes)	1 lote	\$545
3 enriquecimientos del bacteriófago + bacteria en 8 ml TSA 2X	0.024 litros	\$ 3.67
Volumen a preparar de la suspensión de bacteriófagos para administrar en el estanque	2.57 litros	\$ 392.72
Subtotal		\$ 941.38
Número de aplicaciones fagoterapia por estanque (con base a Imbeault <i>et al.</i> , 2006)	2	Total de tratamiento por estanque \$ 1,882.77

*Costo de referencia para los cálculos del costo por volumen de caldo de TSA requerido.

2) PROYECCIÓN DE COSTOS PARA LAS PRUEBAS DE CAMPO

Escalamiento de la producción de bacteriófagos y pruebas de efectividad *in vivo* en ambientes controlados

Objetivos:

- **General**

Evaluación de la efectividad de un cóctel de bacteriófagos contra la infección *in vivo* con *Aeromonas* spp. en condiciones controladas en juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

- **Específicos**

- 1) Escalar la producción de los bacteriófagos individuales que conforman el cóctel.
- 2) Determinar la dosis letal al 50% (LD₅₀) de la(s) cepa(s) de *Aeromonas* spp en trucha arcoíris.
- 3) Evaluar el efecto protector del cóctel de bacteriófagos en una infección controlada con *Aeromonas* spp. *in vivo*.

DISTRIBUCIÓN GLOBAL	MONTO
1.- Equipo	\$ 617,029.48
2.- Reactivos y suministros	\$ 198,345.00
3.- Experimentos <i>in vivo</i>	\$ 60,359.03
4.-Viáticos, colectas	\$ 32,136.00
5.-Salarios	\$ 522,000.00
TOTAL	\$ 1,429,869.50

Equipo	Unidades	Costo/unidad	Costo
Vórtex Genie 2 velocidad 600-3200 RPM	2.00	\$ 7,570.50	\$ 15,141.00
INCUBADORA CON AGITACIÓN modelo MOD. ECO-70B, MCA. ECOSHEL	1.00	\$ 129,110.50	\$ 129,110.50
Bomba de vacío para 21 litros Marca rocker	1.00	\$ 17,482.64	\$ 17,482.64
Incubador con Agitación orbital modelo MaxQ6000 cat: SHKE6000 Marca Thermo Scientific con accesorios	1.00	\$ 338,163.11	\$ 338,163.11
Baño de agua serie myBath de 4L de capacidad	1.00	\$ 23,681.71	\$ 23,681.71
Refrigerador de 11 pies	1.00	\$ 8,343.00	\$ 8,343.00
Subtotal			\$ 531,921.96
Iva			\$ 85,107.51
Total			\$ 617,029.48

Experimentos <i>in vivo</i>	Unidades	Costo/unidad	Costo
Juveniles de trucha arco iris	700.00	\$ 20.60	\$ 14,420.00
Alimento balanceado (bulto de 25 kg)	14.00	\$ 1,133.00	\$ 15,862.00
Infraestructura para la adecuación de las unidades experimentales y manejo de los peces	1.00	\$ 20,600.00	\$ 20,600.00
Anestésico de los peces	1.00	\$ 1,030.00	\$ 1,030.00
Material de bioseguridad (2 tapetes desinfectantes, 3 pares de botas impermeables, 2 cloros de 10 litros, 4 geles antibacteriales de 250 ml, 3 cajas de guantes, 3 cajas de mascarillas quirúrgicas ambiderm)	1.00	\$ 8,447.03	\$ 8,447.03

)			
Total			\$ 60,359.03

Viáticos, colectas	Unidades	Costo/unidad	Costo
Visita a la granja experimental piloto (previo al experimento), muestreo y viáticos durante la evaluaciones para la determinación de la DL ₅₀ y efectividad de fagoterapia en los retos.	24.00	\$ 643.75	\$ 15,450.00
Hospedaje y viáticos	12.00	\$ 1,287.50	\$ 15,450.00
Material de muestreo (bolsas de plástico, hielo, oxígeno) (Lote)	1.00	\$ 1,236.00	\$ 1,236.00
Total			\$ 32,136.00

5.-Salarios	Meses	Costo/unidad	Costo
Laboratorista especializado (análisis microbiológico, bacteriófagos)	12.00	\$ 16,000.00	\$ 192,000.00
Asesoría científica	12.00	\$ 16,000.00	\$ 192,000.00
Técnico laboratorista	12.00	\$ 11,500.00	\$ 138,000.00
Total			\$ 522,000.00

ANEXO 6. ARTÍCULO DE DIVULGACIÓN

“El enemigo de mi enemigo es... Un virus que ataca a las bacterias: los bacteriófagos”

El enemigo de mi enemigo es... Un virus que ataca a las bacterias: los bacteriófagos

María Anel Fuentes Valencia, Adriana Carolina Gil Correa, Carlos Antonio Martínez Palacios, Víctor Manuel Baizabal Aguirre y Juan José Valdez Alarcón

Resumen

Los virus son partículas que infectan a todas las formas de vida. Los virus bacteriófagos, que infectan bacterias, fueron descubiertos antes que los antibióticos. A pesar de su tamaño pequeño, han contribuido al desarrollo científico desde hace décadas, como en el descubrimiento de numerosas enzimas con aplicaciones en la biología molecular¹. En este trabajo se analizarán aspectos generales de la biología de los virus bacteriófagos, su contribución a la salud y se presentarán algunos casos exitosos de la terapia antimicrobiana usando bacteriófagos en humanos y animales. Aunque la terapia con bacteriófagos no cuenta con autorización para su uso global, ya existen formulaciones comerciales de bacteriófagos para la industria alimentaria. Se describirá el arma principal de los bacteriófagos, la endolisina, enzima que “revienta” a las bacterias. Las endolisinas se consideran una alternativa más segura que los bacteriófagos, al carecer de material genético. Los bacteriófagos y las endolisinas tienen aplicaciones revolucionarias en la medicina, como vehículos de transporte de moléculas y generación de vacunas, de fantasmas bacterianos, o en la detección diagnóstica de bacterias patógenas.

Palabras clave: terapia de bacteriófagos, endolisinas, enzibióticos, partículas tipo virus (VLP), fantasmas bacterianos.

THE ENEMY OF MY ENEMY IS... A VIRUS THAT ATTACKS BACTERIA: BACTERIOPHAGES

Abstract

Virus particles infect all life forms. Bacteriophage viruses, the ones that infect bacteria, were discovered before antibiotics. Despite its small size, they have contributed to scientific development such as the discovery of many enzymes with applications in molecular biology. In this paper we describe general aspects of their biology and their contribution to health, along with successful cases of antimicrobial therapy using bacteriophages in humans and animals. Despite the fact that there are no commercial authorizations for its global use, there are commercial bacteriophage formulations for the food industry. We will describe the main weapon of bacteriophages, endolysin, an enzyme useful for lysing bacteria. Endolysins are considered safer than bacteriophages because they lack genetic material. Bacteriophages and endolysins have revolutionary applications in medicine, such as the viral-like particles, useful for small molecules delivery or vaccine design, in the generation of bacterial ghosts and in the diagnostic and detection of pathogenic bacteria.

Keywords: phage therapy, endolysin, viral like particles (VLP), bacterial ghosts.

Recepción: 27/09/2020. Aprobación: 10/03/2021.
DOI: <http://doi.org/10.22201/cuaieed.16076079e.2021.22.4.1>



¹ Biología molecular: disciplina científica que estudia las funciones de la célula a partir de las moléculas que la componen.

María Anel Fuentes Valencia

anel921@hotmail.com

Actualmente está inscrita en el Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, institución en la cual también realizó sus estudios de Maestría en Ciencias Biológicas y de Licenciatura en Biología. Ha participado en distintos proyectos de investigación con vinculación al sector productivo acuícola del país y con instituciones nacionales e internacionales. Tiene experiencia de 8 años en el diagnóstico de enfermedades en los organismos acuáticos. Su principal área de interés en la investigación es el diagnóstico y desarrollo de estrategias alternativas para el tratamiento de enfermedades infecciosas en los organismos acuáticos.

Adriana Carolina Gil Correa

qfbgil@hotmail.com

Recién egresada del Programa de Maestría Institucional en Ciencias Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, institución en la que también realizó sus estudios de licenciatura en Químico-Farmacobiología. Ha participado en diferentes congresos de investigación científica. Cuenta con 8 años de experiencia en microbiología clínica. Su interés actual está en el estudio de los bacteriófagos, sus endolisinas y el desarrollo de estrategias biotecnológicas para el control de las enfermedades infecciosas bacterianas.

Carlos Antonio Martínez Palacios

cpalacios@umich.mx
orcid.org/0000-0003-0703-4599

Profesor investigador de tiempo completo en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, responsable técnico del Laboratorio Nacional de Microbiómica y Nutrigenómica Digestiva Animal (lanmda.mx), CONACYT/UMSNH. *Phylosophy Doctor* por la Universidad de Stirling, Escocia, Reino Unido; *Master in Science* por la Universidad de Stirling en acuicultura y pesquerías, con especialidad en nutrición de organismos acuáticos; Maestro en Ciencias por la UNAM en Biología Marina y Limnología. Biólogo por la Facultad de Ciencias de la UNAM. Desarrolla Investigación sobre especies de peces nativas y exóticas en nutrigenómica, microbiómica y nutrición. Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores, nivel III, cuenta con perfil PROMEP, líder del Cuerpo académico consolidado en Biotecnología Acuícola y Acuicultura UMSNH-CA-142.

Víctor Manuel Baizabal Aguirre

baizabal@umich.mx
orcid.org/0000-0001-6816-0404

Profesor e Investigador de tiempo completo en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Se graduó de Doctor en Ciencias en Biotecnología de Plantas en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (unidad Irapuato). Durante sus estudios de doctorado se dedicó a estudiar las vías de transducción de señales mediadas por proteína cinasas dependientes de calcio, desde una perspectiva bioquímica. Realizó una estancia posdoctoral como *Pew Latin American Fellow in Biomedical Sciences* en el Department of Biology and Molecular Genetics de la Universidad de California, San Diego, La Jolla, USA, donde se dedicó al estudio de la regulación de los canales de K⁺ regulados por voltaje. Fue Profesor visitante durante un año en el Michael Smith Laboratory de la Universidad de British Columbia, Vancouver, Canadá, donde desarrolló un proyecto de investigación sobre las respuestas moleculares que se activan en células endoteliales durante la infección por bacterias patógenas. Sus proyectos de investigación se centran en el descubrimiento, diseño y optimización de compuestos orgánicos de bajo peso molecular que se unan con alta afinidad y modifiquen la actividad de proteínas/enzimas que intervienen en procesos inflamatorios. Para lograr lo anterior, su laboratorio desarrolla modelado molecular por computadora, combinado con técnicas bioquímicas. Actualmente es Investigador Nacional SNI nivel II y tiene nombramiento de perfil deseable PRODEP. Integrante del Cuerpo Académico Consolidado Microbiología Celular y Genética Molecular UMSNH-CA-188.

Juan José Valdez Alarcón

jose.alarcon@umich.mx
orcid.org/0000-0002-0378-5021

Profesor Investigador titular de tiempo completo en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Doctorado en Biotecnología de Plantas por el Centro de Investigación y Estudios Avanzados, y Licenciado Químico Bacteriólogo y Parasitólogo por la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, ambos del Instituto Politécnico Nacional. Formó parte de la mesa directiva de la Asociación Mexicana de Microbiología (2017-2019) Los proyectos de investigación que desarrolla son en epidemiología molecular de enfermedades infecciosas, en el aislamiento y estudio de bacteriófagos y sus endolisinas para el control de enfermedades infecciosas y en el estudio de la regulación de la expresión genética de bacterias patógenas en el contexto de la endocrinología microbiana. Ha sido integrante del Sistema Nacional de Investigadores Nivel I (2003-2019) y actualmente cuenta con el nombramiento de Perfil deseable del PRODEP. Integrante del Cuerpo Académico Consolidado Microbiología Celular y Genética Molecular UMSNH-CA-188.

Introducción

Al escuchar la palabra "virus" reaccionamos con temor debido a las experiencias recientes por la pandemia causada por el coronavirus SARS-CoV-2. El significado de la palabra *virus* proviene del latín que significa veneno o ponzoña. Los virus infectan a los animales, plantas, hongos y a las bacterias. Los *bacteriófagos*, también llamados *fagos*, son un tipo de virus, y son partículas formadas por moléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) y proteínas. Ellos infectan exclusivamente a las bacterias y son sus enemigos naturales. Los virus bacteriófagos son parásitos, que secuestran y utilizan los componentes de la célula para reproducirse (Salmond y Fineran, 2015).

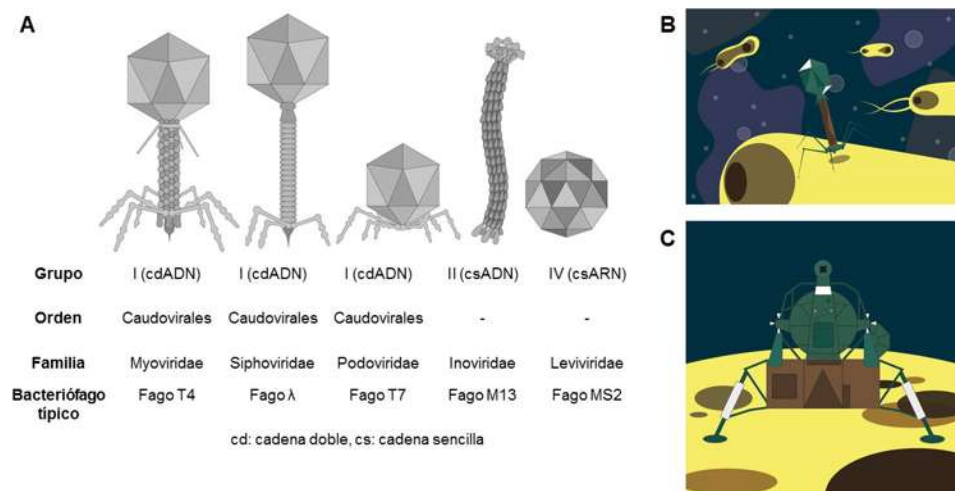
Un descubrimiento "viral"

Los bacteriófagos fueron descubiertos, antes que los antibióticos, de manera independiente por Frederick Twort en 1915 y Félix d'Hérelle en 1917 (Salmond y Fineran, 2015). Su descubrimiento se considera uno de los más importantes en la historia moderna de la investigación biomédica, ya que fueron considerados como una herramienta muy prometedora contra las infecciones bacterianas. Félix d'Hérelle, en 1919, en París, fue el primer científico en administrar bacteriófagos por vía oral a niños con diarrea ocasionada por una infección con la bacteria *Shigella dysenteriae*. Los niños se recuperaron en 24 horas (Sulakvelidze y Kutter, 2005). No obstante, con el descubrimiento de la penicilina, el primer antibiótico, por Sir Alexander Fleming en 1928, los bacteriófagos quedaron relegados a un segundo plano.

Conociendo al enemigo íntimo de las bacterias

Los bacteriófagos, como todos los virus, están compuestos por una cubierta protectora de proteína llamada cápside, que asemeja a una cápsula de alunizaje, como la que llevó al hombre a la luna (ver figura 1). Dentro contiene material genético, que puede ser ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN). Los bacteriófagos se clasifican con base en la forma de su cápside (si tienen cola, si la cápside presenta formas variadas, o si es filamentosa o poliédrica; ver figura 1).

Figura 1. Familias de bacteriófagos y sus representantes. A. Clasificación de bacteriófagos de acuerdo con la forma de su cápsula y al tipo de ácido nucleico (ADN o ARN). B. Bacteriófago próximo a unirse a la superficie de una célula. C. Módulo lunar sobre la superficie de la luna. El "cuello" del bacteriófago es un canal por el que el ADN o ARN se inyecta en la bacteria, semejante al túnel de salida del módulo lunar por donde desembarcan los astronautas.



Los bacteriófagos miden entre 50 y 200 nm (1 nm = 1 mil millonésima parte de un metro) (Richter *et al.*, 2018) y sólo pueden ser visibles con un microscopio electrónico. Son las entidades biológicas más abundantes en la Tierra, superando 10 veces el número de bacterias en algunos ecosistemas (Dion *et al.*, 2020). Los bacteriófagos son abundantes en el medio acuático, suelo, plantas y en los animales. En los humanos, los fagos se pueden encontrar en la piel, la boca, el estómago y el intestino, donde se han encontrado hasta 100 millones de partículas virales por ml de filtrados fecales (Hoyle *et al.*, 2014).

¿Cómo infectan los bacteriófagos a las bacterias?

Los bacteriófagos reconocen de manera muy específica a las bacterias que invadirán. Para ello, se adhieren a la superficie bacteriana e inyectan su material genético dentro de la célula. Si el material genético del fago se combina con el material genético de la bacteria anfitriona, se le llama *profago*; en este caso, ambos se pueden replicar simultáneamente y la bacteria no es destruida, lo que se conoce como el *ciclo de vida lisogénico* del fago (Melo *et al.*, 2020). En el caso de los *fagos líticos*, en cambio, al inyectar su material genético, éste es leído e interpretado por la bacteria para producir más moléculas de ADN o ARN del fago,

proteínas de la cápside y una enzima llamada endolisina, que, en cuestión de minutos a horas, destruye a sus anfitriones, para liberar miles de bacteriófagos (ver figura 2). Este *ciclo* lítico se repite hasta que se agotan las bacterias por secuestrar. Los fagos líticos se consideran idóneos para el control de enfermedades de origen bacteriano (Melo *et al.*, 2020).

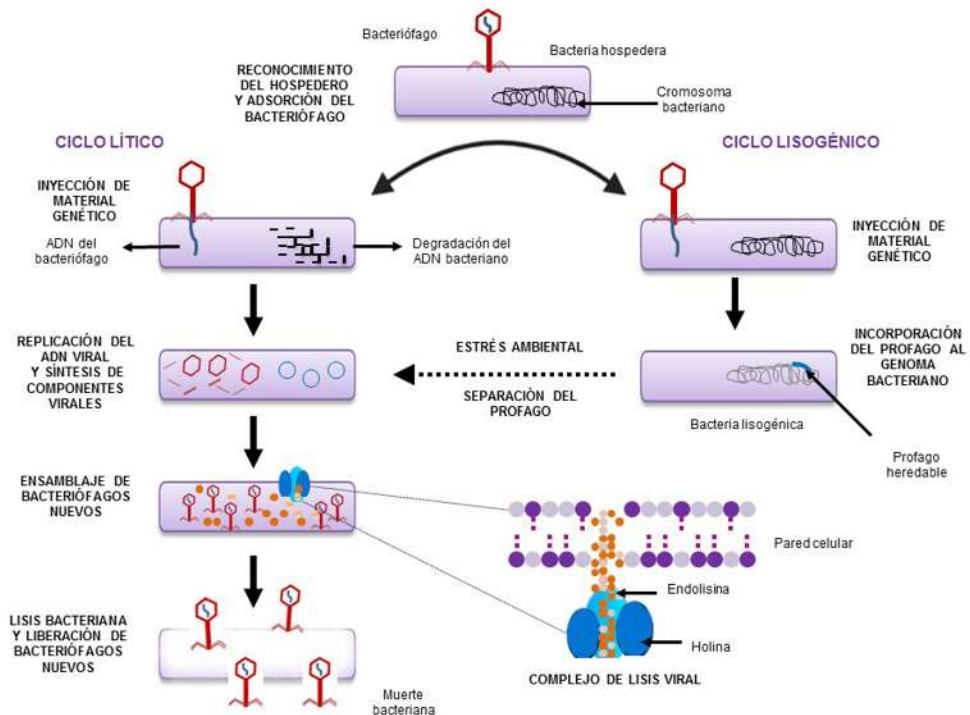


Figura 2. Ciclos de vida de los bacteriófagos.

Los bacteriófagos y el avance de la biología molecular

El estudio de los bacteriófagos contribuyó al conocimiento de la biología molecular. Hershey y Chase, en 1952, al estudiar un bacteriófago, demostraron que los genes estaban hechos de ácidos nucleicos. De la interacción entre bacteria y bacteriófago se descubrieron varias enzimas. Entre ellas las *enzimas de restricción*, que las bacterias utilizan como "tijeras moleculares", para cortar el ADN del virus infectante; la *ligasa*, que actúa como "pegamento molecular". De igual manera, el material genético de un bacteriófago se ha usado como vector molecular¹.

Dichas herramientas tienen diferentes aplicaciones en la biología molecular, la ingeniería genética² y la biotecnología. Por ejemplo, la ARN polimerasa y la ribonucleasa H de bacteriófagos de *Escherichia coli* se usan como herramientas en biología sintética³, y en un futuro podrían utilizarse para nanodispositivos y en la construcción de los genomas para células artificiales que realicen funciones útiles para la humanidad (Kim y Winfre, 2011). Asimismo, una de las herramientas de edición genética más recientes y versátiles, CRISPR-Cas⁴, deriva de un mecanismo de defensa bacteriano contra los bacteriófagos, y permite la ingeniería genética *in vivo* en bacterias y células más complejas, como las de mamíferos o plantas (Mei *et al.*, 2016).

¹ *Vector molecular*. El material genético del bacteriófago es modificado y se utiliza para transportar y almacenar información genética de otros organismos.

² Ingeniería genética: es el uso de las "tijeras moleculares", el "pegamento molecular" y otras enzimas para modificar la información genética de un organismo.

³ La Biología Sintética es el uso de la ingeniería genética para el diseño de sistemas biológicos con propiedades nuevas que normalmente no se encuentran en la naturaleza.

⁴ De siglas en inglés que significan repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas asociadas a la nucleasa Cas9.

Terapias con bacteriófagos

Un proverbio árabe dice: "el enemigo de mi enemigo es mi amigo". Por ello, como los bacteriófagos destruyen a las bacterias que nos atacan y enferman, entonces, son nuestros aliados. En este sentido, el interés en el uso de los bacteriófagos para el control de enfermedades es cada vez mayor, principalmente debido al incremento de las bacterias resistentes a varios tipos de antibióticos, las llamadas superbacterias, cada vez más difíciles de combatir. Las superbacterias son un problema de salud pública urgente, ya que cada vez hay menos antibióticos nuevos y efectivos. Los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades estiman 2.8 millones de infecciones por superbacterias en los Estados Unidos, que cada año causan más de 35,000 muertes (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2020). También la Organización Mundial de la Salud (OMS) alerta de la importancia en el incremento de las superbacterias, por lo que actualmente establece políticas y estrategias de control bajo el enfoque integral de "Una Salud", que considera la salud humana, animal, vegetal y el ambiente (OMS, 2020).

La terapia de bacteriófagos, que utiliza fagos para tratar las infecciones bacterianas, existe desde el siglo pasado y presenta numerosas ventajas en comparación con la terapia con antibióticos (Melo *et al.*, 2020):

- 1) Los bacteriófagos son abundantes en la naturaleza y de bajo costo: un solo bacteriófago puede aniquilar a un número elevado de bacterias.
- 2) Los bacteriófagos líticos destruyen por completo a las bacterias, a diferencia de los antibióticos bacteriostáticos⁵, que dificultan la reproducción de las bacterias, pero no las eliminan.
- 3) Los bacteriófagos son muy específicos. Infectan únicamente a su bacteria hospedera, dejando intactas a otras bacterias benéficas. Además, no infectan a los humanos, animales o plantas.
- 4) Es una terapia activa⁶, una sola dosis es suficiente para el control de la infección bacteriana. Mientras existan bacterias, los bacteriófagos continuarán replicándose; una vez eliminadas, también dejarán de multiplicarse.
- 5) Los bacteriófagos pueden cambiar (mutar) para evadir las defensas de las bacterias. Es posible usar mezclas (cócteles) de bacteriófagos para evitar el desarrollo de resistencia bacteriana.
- 6) Los bacteriófagos no causan alergias como lo hacen algunos antibióticos.

Bacteriófagos al rescate de la salud humana y animal

Durante 1950 en Europa, África y en los Estados Unidos, se utilizaron preparaciones preventivas y terapéuticas de bacteriófagos que fueron desplazadas por los antibióticos en el mercado. Los bacteriófagos terapéuticos se administran en los humanos a través diversas rutas: por aerosol, intravenosa, oral, rectal y tópica, para el tratamiento de diversas infecciones bacterianas (Melo *et al.*, 2020).

⁵ Bacteriostático: antibiótico que retrasa o impide el crecimiento de una bacteria, pero no la mata.

⁶ Terapia activa, una vez administrada su efecto es duradero.

Los bacteriófagos son muy seguros, dado que hemos estado expuestos a ellos desde que estuvimos en el útero y hemos desarrollado tolerancia a su presencia. Existen ensayos clínicos y casos de éxito de la fagoterapia, sobre todo en Europa (Sulakvelidze y Kutter, 2005). A pesar de su éxito, ningún bacteriófago cuenta con aprobación para su uso terapéutico en humanos, aunque algunos productos terapéuticos con base en bacteriófagos cuentan con autorización por la Unión Europea para aplicarse en las granjas avícolas. A la fecha sólo algunas formulaciones de bacteriófagos en la industria alimentaria humana se autorizan por la Agencia Federal de Medicamentos y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos, quien los considera como "generalmente seguros".

Existen casos, científicamente documentados, de terapia con bacteriófagos exitosa en los humanos. Thomas Patterson, un paciente diabético con pancreatitis infecciosa por *Acinetobacter baumannii* con multirresistencia a los antibióticos, recibió una terapia personalizada, un cóctel de nueve bacteriófagos con potencial destructor, administrado en las cavidades de los abscesos. Después de dicho tratamiento el paciente recuperó su salud, sin presentar efectos negativos a causa de la terapia con bacteriófagos (Schooley *et al.*, 2017). Otro caso es el de Isabelle Camell-Holdaway, una adolescente de 15 años con fibrosis quística, una enfermedad genética que afecta la función pulmonar. Al mes de someterse a un trasplante de pulmones presentó una infección en todo el cuerpo con llagas ocasionadas por *Mycobacterium abscessus*. A pesar de que los médicos estimaron una sobrevivencia nula, la administración de un cóctel de bacteriófagos mejoró notablemente la salud de la joven, incluso las heridas abiertas lograron cerrarse (Dedrick *et al.*, 2019). Asimismo, los bacteriófagos rescatan la salud de animales terrestres y acuáticos. Algunos casos de éxito se observan en la tabla 1.

Uso	Organismo/ producto alimenticio	Bacteriófago	Patógeno	Aplicación resultados	Cita
Medicina veterinaria	Perros	Cóctel de 6 bacteriófagos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Topica. Redujo las bacterias a las 48 h. Primer informe de terapia con bacteriófagos.*	Hawkins <i>et al.</i> , 2010
Medicina veterinaria	Truchas arco iris	PAS-1	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Inyección intramuscular. Incrementó la supervivencia de los peces. Ausencia de lesiones externas.	Kim <i>et al.</i> , 2013
Diagnóstico clínico	Humano	φA1122 y L-413C	<i>Yersinia pestis</i>	La detección molecular de los bacteriófagos permitió una identificación bacteriana rápida.	Sergueev <i>et al.</i> , 2015

Tabla 1. Ejemplos de aplicaciones de los bacteriófagos en la salud humana y animal.
 *Bajo la legislación Europea

Inocuidad alimentaria	Carne cruda y cocinada	Cóctel de 3 bacteriófagos para cada bacteria	<i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Escherichia coli</i> O157:H7	Bioadsorbentes en membranas de celulosa en carne contaminada Biocontrol eficiente bacteriano	Anany <i>et al.</i> , 2011
-----------------------	------------------------	--	---	---	----------------------------

Las armas virales: las endolisinas y sus aplicaciones

Los bacteriófagos producen *holinas* (proteínas formadoras de poro), que permiten la salida de las *endolisinas*, enzimas que degradan la pared celular bacteriana (Gondil *et al.*, 2020; ver figura 2). Las endolisinas se consideran *enzimbióticos* (enzimas con actividad antibiótica) con potencial para el tratamiento de infecciones bacterianas multirresistentes. Ya que son de naturaleza proteica, las endolisinas se consideran aún más seguras que los bacteriófagos al estar libres de material genético (Gondil *et al.*, 2020). Hasta el momento no se ha identificado desarrollo de resistencia bacteriana a ellas, debido a que las moléculas que degradan poseen estructuras que prácticamente no cambian. Las endolisinas tienen un espectro de acción más amplio que los bacteriófagos, lo cual las hace más atractivas como fármacos. Existen investigaciones sobre la actividad antimicrobiana de las endolisinas con diversas aplicaciones (ver tabla 2), pero aún no existen fármacos comerciales basados en endolisinas.

Uso	Organismo / producto alimenticio	Endolisina	Patógeno	Aplicación y resultados	Cita
Medicina humana y veterinaria	Células pulmonares humanas y ratones	LysSS (endolisina de bacteriófago vs <i>Salmonella enterica</i>)	<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , enterobacterias	<i>In vitro</i> resultó ser un biocontrol efectivo para bacterias Gram- y Gram+. Ausencia de efectos citotóxicos en las células humanas Inyección intraperitoneal protegió a ratones con infección por <i>A. baumannii</i>	Kim <i>et al.</i> , 2020
Agricultura	Planta de papa	Lisozima del Bacteriófago T4	<i>Erwinia carotovora</i>	Tecnología genética Las plantas con el gen de la lisozima fueron resistentes a la infección bacteriana.	Düring <i>et al.</i> , 1993
Medicina veterinaria	Mamíferos	SAL200	<i>S. aureus</i>	Inyección intravenosa en distintos modelos animales. Reducción de las bacterias en la sangre. Incrementó significativamente la sobrevivencia de los animales.	Jun <i>et al.</i> , 2013; 2016

Tabla 2. Ejemplos de aplicaciones de las endolisinas.

Inocuidad alimentaria	Leche de soya	LysZ5	<i>Listeria monocytogenes</i>	Directa en leche contaminada. Reducción de la bacteria (3 h, 4°C)	Zhang <i>et al.</i> , 2012
-----------------------	---------------	-------	-------------------------------	---	----------------------------

Las endolisinas son útiles para el control de las biopelículas (acumulaciones de bacterias que secretan moléculas que las protegen y que dificultan la efectividad de los antibióticos; Love *et al.*, 2018). Las endolisinas también se emplean para la desinfección de equipo hospitalario, y la elaboración y empaque de alimentos (Barrera *et al.*, 2015). Dichas proteínas tienen un potencial importante en la industria alimentaria como aditivos antimicrobianos o de ser producidas por bacterias ácido lácticas modificadas, en procesos de fermentación. La endolisinas también tienen potencial de aplicación para el control de infecciones bacterianas en diversos sectores productivos, tal como el agropecuario y el acuícola (Zduńczyk y Janowski, 2020; Zermeño *et al.*, 2018).

Los bacteriófagos también son útiles de otras maneras

Utilizando solamente las proteínas de la cápside del bacteriófago se construyen las partículas tipo virus (VLPS, por sus siglas del inglés *Viral Like Particles*), las cuales sirven para el diseño de vacunas contra infecciones virales. Las VLPS carecen de material genético para producir una infección, por lo que se consideran una estrategia segura para la inducción de anticuerpos neutralizantes, por ejemplo, contra la influenza. En esta vacuna, modificaron un bacteriófago filamentoso de *E. coli* y le insertaron una proteína del virus de influenza. El bacteriófago generó respuesta inmunológica protectora, en modelos animales, contra una dosis letal del virus de la influenza (Deng *et al.*, 2015). De una manera similar, las VLPS derivadas de los bacteriófagos de cola se emplean para la generación de vacunas para enfermedades no infecciosas (cánceres de mama, pulmón, hígado, próstata y de piel).

Las endolisinas se utilizan para generar los llamados *fantasmas bacterianos* (*Bacterial Ghosts* o BGS, en inglés), células bacterianas que perdieron su contenido celular, quedando solamente la envoltura celular. La endolisina E del bacteriófago PhiX174 ocasiona la lisis celular de la bacteria en la que se produce, y una nucleasa procedente de *Staphylococcus aureus* (SNUC) degrada el ADN para garantizar que los BGS están libres de ácidos nucleicos. Los BGS se utilizan como sustitutos de las vacunas atenuadas por calor o inactivadas por tratamientos químicos; a diferencia de éstos, conservan la estructura tridimensional de sus proteínas lo que mejora su eficiencia como vacunas (Barrera *et al.*, 2015). Con los BGS se han inmunizado a distintos modelos animales contra las bacterias: *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella enterica*. Los BGS se pueden emplear como micro-biorreactores para realizar reacciones enzimáticas, como transportadores de plaguicidas contra patógenos de plantas y en la entrega de medicamentos en la terapia antitumoral. Lo anterior permite una mayor especificidad hacia las células tumorales y una reducción en la cantidad de medicamento por aplicación (Hajam *et al.*, 2017). Los bacteriófagos también

se utilizan para el envío de genes reporteros a las bacterias y así generar un sistema para la detección de bacterias como *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *S. Typhimurium*, *Yersinia pestis* y *Bacillus anthracis* (Bardy *et al.*, 2016).

Así, los bacteriófagos y las endolisinas son útiles para la detección rápida de las bacterias (Bai *et al.*, 2016), y, por su especificidad para unirse a ellas, se pueden utilizar como biosondas, que presentan ventajas en comparación con los anticuerpos: replicación en gran número a un bajo costo y estabilidad ante condiciones desfavorables –variaciones en el pH, temperatura y salinidad (Bardy *et al.*, 2016)–. Para la detección bacteriana, se utilizan también los dominios de unión de la pared celular bacteriana (CBD) de las endolisinas, debido a su unión específica con el huésped. Los CBD podrían ser candidatos potenciales para reemplazar los anticuerpos en la detección rápida y la determinación de la concentración de patógenos, ya que presentan una especificidad mayor y son más económicos (Bai *et al.*, 2016).

Conclusiones

En nuestra historia, en un planeta lleno de virus, dentro de los cuales los bacteriófagos predominan y nos continuarán sorprendiendo, su estudio ha representado grandes avances para el desarrollo científico, particularmente para la biotecnología molecular y la biomedicina. La investigación de los bacteriófagos líticos nos permitirá emplearlos como nuestros aliados ante la guerra microbiana y en la mejora de los sectores productivos. En esta época post-antibiótica, el futuro de la terapia con bacteriófagos y sus endolisinas parece ser prometedor y versátil. No obstante, aún se requiere de investigación clínica que consolide finalmente la terapia con bacteriófagos. Además, éstos se consideran una tecnología verde, amigable con el medio ambiente y presentan otras cualidades que aún nos queda por explotar para el rescate de la salud humana, animal y vegetal.

Agradecimientos

El trabajo de bacteriófagos recibe apoyo del proyecto SENASICA "Desarrollo de una estrategia alternativa al uso de antibióticos para el biocontrol de cepas prevalentes de *Aeromonas* spp. en granjas trutícolas de Michoacán", del Laboratorio Nacional de Nutrigenómica y Microbiómica Digestiva Animal y de la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Los autores agradecen a la Lic. en Diseño Gráfico Andrea Valdez Chávez por su colaboración en la elaboración de la Figura 1.

Referencias

- ❖ Anany, H., Chen, W., Pelton, R. y Griffiths, M. W. (2011). Biocontrol of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 in meat by using phages immobilized on modified cellulose membranes. *Applied and environmental microbiology*, 77(18), 6379-6387. <https://doi.org/10.1128/AEM.05493-11>

- ❖ Bai, J., Kim, Y. T., Ryu, S. y Lee, J. H. (2016). Biocontrol and rapid detection of food-borne pathogens using bacteriophages and endolysins. *Frontiers in microbiology*, 7, 474. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00474>
- ❖ Bárdy, P., Pantůček, R., Benešík, M. y Doškař, J. (2016). Genetically modified bacteriophages in applied microbiology. *Journal of Applied Microbiology*, 121(3), 618-33. <https://doi.org/10.1111/jam.13207>
- ❖ Barrera, R. C.I., Cajero, J.M., Oviedo, B. J., Nuñez A. R. E., Kawabe, K. L. y Alarcón, V. J. J. (2015). Advances in the use of endolysins: general remarks, structure, applications, genetic modifications and perspectives. En A. Mendez-Vilas (Ed), *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs* (pp. 259-268). Formatex Research Center.
- ❖ Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2020, 13 de marzo). *Antibiotic / Antimicrobial Resistance (AR/AMR). About Antibiotic Resistance*. <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>
- ❖ Chauthaiwale, V. M., Therwath, A. y Deshpande, V. V. (1992). Bacteriophage lambda as a cloning vector. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 56(4), 577-591.
- ❖ Dedrick, R. M., Guerrero, B. C. A., Garlena, R. A., Russell, D. A., Ford, K., Harris, K., Gilmour K. C., Soothill J., Jacobs S. D., Schooley R. T., Hatfull, G. F. y Spencer, H. (2019). Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nature medicine*, 25(5), 730-733. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0437-z>
- ❖ Deng, L., Ibañez, L. I., Van den Bossche, V., Roose, K., Youssef, S. A., De Bruin, A., Fiers W. y Saelens, X. (2015). Protection against influenza A virus challenge with M2e-displaying filamentous *Escherichia coli* phages. *PLoS One*, 10(5), e0126650. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126650>
- ❖ Dion, M. B., Oechslin, F. y Moineau, S. (2020). Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nature Reviews Microbiology*, 18, 125-138. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0311-5>
- ❖ Düring, K., Porsch, P., Fladung, M. y Lörz, H. (1993). Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora*. *The Plant Journal*, 3(4), 587-598. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1993.03040587.x>
- ❖ Gondil, V. S., Harjai, K. y Chhibber, S. (2020). Endolysins as emerging alternative therapeutic agents to counter drug-resistant infections. *International journal of antimicrobial agents*, 55(2), 105844. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.11.001>
- ❖ Hajam, I. A., Dar, P. A., Won, G. y Lee, J. H. (2017). Bacterial ghosts as adjuvants: mechanisms and potential. *Veterinary Research*, 48, 37. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0442-5>
- ❖ Hawkins, C., Harper, D., Burch, D., Änggård, E. y Soothill, J. (2010). Topical treatment of *Pseudomonas aeruginosa* otitis of dogs with a bacteriophage mixture: a before/after clinical trial. *Veterinary microbiology*, 146(3-4), 309-313. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.05.014>

- ❖ Hoyles, L., McCartney, A. L., Neve, H., Gibson, G. R., Sanderson, J. D., Heller, K. J. y Van Sinderen, D. (2014). Characterization of virus-like particles associated with the human faecal and caecal microbiota. *Research in microbiology*, 165(10), 803-812. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.10.006>
- ❖ Jackson, D. A., Symons, R. H. y Berg, P. (1972). Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(10), 2904-2909. <https://doi.org/10.1073/pnas.69.10.2904>
- ❖ Jun, S. Y., Jung, G. M., Yoon, S. J., Oh, M. D., Choi, Y. J., Lee, W. J. y Kang, S. H. (2013). Antibacterial properties of a pre-formulated recombinant phage endolysin, SAL-1. *International journal of antimicrobial agents*, 41(2), 156-161. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.10.011>
- ❖ Jun, S. Y., Jung, G. M., Yoon, S. J., Youm, S. Y., Han, H. Y., Lee, J. H. y Kang, S. H. (2016). Pharmacokinetics of the phage endolysin-based candidate drug SAL 200 in monkeys and its appropriate intravenous dosing period. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 43(10), 1013-1016. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12613>
- ❖ Kim, J. H., Choresca, C. H., Shin, S. P., Han, J. E., Jun, J. W. y Park, S. C. (2013). Biological Control of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* Infection in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Using *Aeromonas* Phage PAS-1. *Transboundary and emerging diseases*, 62(1), 81-86. <https://doi.org/10.1111/tbed.12088>
- ❖ Kim, J. y Winfree, E. (2011). Synthetic *in vitro* transcriptional oscillators. *Molecular systems biology*, 7, 465. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.119>
- ❖ Kim, S., Lee, D. W., Jin, J. S. y Kim, J. (2020). Antimicrobial activity of LysSS, a novel phage endolysin, against *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 22, 32-39. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.01.005>
- ❖ Love, M. J., Bhandari, D., Dobson, R. C. y Billington, C. (2018). Potential for bacteriophage endolysins to supplement or replace antibiotics in food production and clinical care. *Antibiotics*, 7(1), 17. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7010017>
- ❖ Mei, Y., Wang, Y., Chen, H., Sun, Z. S. y Ju, X. D. (2016). Recent progress in CRISPR/Cas9 technology. *Journal of Genetics and Genomics*, 43(2), 63-75. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2016.01.001>
- ❖ Melo, L. D., Oliveira, H., Pires, D. P., Dabrowska, K. y Azeredo, J. (2020). Phage therapy efficacy: a review of the last 10 years of preclinical studies. *Critical Reviews in Microbiology*, 46(1), 78-99. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1729695>
- ❖ Organización Mundial de la Salud (OMS). (2020, septiembre). El enfoque multisectorial de la OMS "Una salud". <https://www.who.int/features/qa/one-health/es/>
- ❖ Richter, L., Janczuk R., M., Niedziółka J.J., Paczesny J., Hołyst, R. (2018). Recent advances in bacteriophage-based methods for bacteria detection. *Drug Discovery Today*, 23(2), 448-455. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.11.007>

- ❖ Salmond, G. P. y Fineran, P. C. (2015). A century of the phage: past, present and future. *Nature Reviews Microbiology*, 13(12), 777-786. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3564>
- ❖ Sergueev, K. V., He, Y., Borschel, R. H., Nikolich, M. P. y Filippov, A. A. (2010). Rapid and sensitive detection of *Yersinia pestis* using amplification of plague diagnostic bacteriophages monitored by real-time PCR. *PLoS One*, 5(6), e11337. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011337>
- ❖ Schooley, R. T., Biswas, B., Gill, J. J., Hernández M. A., Lancaster, J., Lessor, L. y Segall, A. M. (2017). Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *Acinetobacter baumannii* infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(10), e00954-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00954-17>
- ❖ Sulakvelidze, A. y Kutter, E. (2004). Bacteriophage Therapy in Humans. En E. Kutter y A. Sulakvelidze (Eds.), *Bacteriophages: biology and applications*. CRC-Press. <https://doi.org/10.1201/9780203491751.ch14>
- ❖ Zermelo-Cervantes, L. A., Makarov, R., Lomelí-Ortega, C. O., Martínez-Díaz, S. F. y Cardona-Félix, C. S. (2018). Recombinant Lys_{VPMS 1} as an endolysin with broad lytic activity against *Vibrio parahaemolyticus* strains associated to acute hepatopancreatic necrosis disease. *Aquaculture Research*, 49(4), 1723-1726. <https://doi.org/10.1111/are.13577>
- ❖ Zduńczyk, S. y Janowski, T. (2020). Bacteriophages and associated endolysins in therapy and prevention of mastitis and metritis in cows: Current knowledge. *Animal Reproduction Science*, 218, 106504. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106504>
- ❖ Zhang, H., Bao, H., Billington, C., Hudson, J. A. y Wang, R. (2012). Isolation and lytic activity of the *Listeria* bacteriophage endolysin LysZ5 against *Listeria monocytogenes* in soya milk. *Food microbiology*, 31(1), 133-136. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.01.005>

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

- ❖ Fuentes Valencia, María Anel, Gil Correa, Adriana Carolina, Martínez Palacios, Carlos Antonio, Baizabal Aguirre, Víctor Manuel y Valdez Alarcón, Juan José. (2021, julio-agosto). El enemigo de mi enemigo es... Un virus que ataca a las bacterias: los bacteriófagos. *Revista Digital Universitaria* (), 22(4). <http://doi.org/10.22201/cuaieed.16076079e.2021.22.4.1>