

Identification of pathogenic bacteria in fishes caught in the Pacific off Nicaragua

Identificación de bacterias patógenas en peces capturados en el Pacífico frente a Nicaragua

Byron Flores^{1*}, Nelly González², Arlen Bravo², Brenda Mora-Sánchez¹, Dayana Torres¹, William Jirón¹, Jessica Sheleby-Elías¹, José L Balcázar³

¹ Centro Veterinario de Diagnóstico e Investigación, Departamento de Veterinaria y Zootecnia, Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinarias, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León, Carretera a La Ceiba 1 km al Este, León, Nicaragua.

² Departamento Acuícola, Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinarias, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León, Carretera a La Ceiba 1 km al Este, León, Nicaragua.

³ Catalan Institute for Water Research, Girona, 17003, Spain.

* Corresponding author. E-mail: byron.flores@ev.unanleon.edu.ni

ABSTRACT. The aim of this study was to identify pathogenic bacteria in fishes from 4 communities on the western Pacific coast of Nicaragua. A total of 62 fishes were collected for microbiological analysis using muscle samples, which were inoculated on thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar and trypticase soy agar. Bacterial identification was carried out by biochemical tests and tests of tolerance to different NaCl concentrations, and the Kirby–Bauer method was used to determine the bacterial resistance. The results revealed the presence of *Vibrio metschnikovii* in 30.64% (95% CI: 18.36–42.92) of the fish samples, while *Salinivibrio costicola* was detected in 22.58% (95% CI: 11.37–33.79) of the samples. Coagulase-negative staphylococci (CoNS) were detected in 82.30% (95% CI: 71.94–92.57) of the samples. Species of the genus *Vibrio* were detected at a concentration of 3.9×10^3 CFU·g⁻¹ in fish samples from the Las Peñitas community and 2.52×10^3 CFU·g⁻¹ in samples from Poneloya, and these values were significantly higher ($P = 0.003$) than those found for samples from El Tránsito (5.25×10^2 CFU·g⁻¹). Furthermore, 100% of the *V. metschnikovii* and *S. costicola* strains were resistant to amoxicillin/clavulanic acid and sensitive to ciprofloxacin. The bacterial load for *S. costicola* is typical of marine environments and does not represent a health hazard. However, *V. metschnikovii* can be present in raw fish and it therefore represents a public health hazard, as do CoNS, which are indicators of anthropogenic contamination.

Key words: fish, *Vibrio*, Nicaragua, *Staphylococcus*.

RESUMEN. El objetivo de este estudio fue identificar bacterias patógenas en peces procedentes de 4 comunidades en la costa del Pacífico en el occidente de Nicaragua. Se recolectaron 62 peces para realizar el análisis microbiológico a partir de muestras de músculo, las cuales fueron inoculadas en agar tiosulfato citrato bilis sacarosa y agar tripticosa de soja. La identificación bacteriana se realizó mediante pruebas bioquímicas y de tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl, y para determinar la resistencia bacteriana, se empleó el método Kirby-Bauer. Los resultados mostraron presencia de *Vibrio metschnikovii* en un 30.64% (IC 95%: 18.36–42.92) de las muestras de peces, mientras que *Salinivibrio costicola* fue detectada en un 22.58% (IC 95%: 11.37–33.79) de las muestras. *Staphylococcus coagulasa* negativa (SCN) fue detectada en un 82.30% (IC 95%: 71.94–92.57) de las muestras. Especies del género *Vibrio* fueron detectadas a una concentración de 3.9×10^3 UFC·g⁻¹ en las muestras de peces de la comunidad Las Peñitas y de 2.52×10^3 UFC·g⁻¹ en las de Poneloya, y estos valores fueron significativamente mayores ($P = 0.003$) que aquellos encontrados para las muestras de El Tránsito (5.25×10^2 UFC·g⁻¹). Además, el 100% de las cepas de *V. metschnikovii* y *S. costicola* fueron resistentes a amoxicilina/ácido clavulánico y sensibles a ciprofloxacina. La carga bacteriana de *S. costicola* es propia de ambientes marinos y no representa riesgo sanitario. Sin embargo, *V. metschnikovii* puede estar presente en el pescado crudo y, por lo tanto, representa un peligro para la salud pública, así como también lo es SCN, que es un indicador de contaminación antropogénica.

Palabras clave: peces, *Vibrio*, Nicaragua, *Staphylococcus*.

INTRODUCTION

Nicaragua has wide coasts along the Pacific Ocean (410 km) and the Caribbean Sea (530 km) that are used for fishing and aquaculture, representing a significant contribution to the national economy (ProNicaragua 2019). Fishing in Nicaragua not only contributes to the food security of the population by increasing food supplies, providing animal protein and other nutrients, but also by generating jobs and

INTRODUCCIÓN

Nicaragua posee amplias costas del lado del océano Pacífico (410 km) y del lado del mar Caribe (530 km), las cuales son aprovechadas para la pesca y la acuicultura, con un aporte significativo a la economía nacional (ProNicaragua 2019). La actividad pesquera en Nicaragua no solo aporta a la seguridad alimentaria de la población al aumentar el abastecimiento de alimentos y, por tanto, proveer proteína

income to meet other needs (FAO 2014). Small-scale fishing activities on the Pacific coast of the country have targeted mainly snappers (*Lutjanus* spp.), groupers (*Epinephelus striatus*), mullets (*Mugil* spp.), pomfret (*Brama brama*), and croakers (*Cynoscion* spp.) (FAO 2018). However, the intensification of fishing activities has been accompanied by an increase in emerging and reemerging diseases (Ghaly et al. 2010).

Lutjanus guttatus and *Mugil cephalus* fishes caught in the wild can carry pathogenic bacteria, such as *Aeromonas* spp., *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus* (Gomez-Gil et al. 2007, Hassen et al. 2020), whereby they could be considered a reservoir or vehicle for foodborne infections and, therefore, a threat to public health (Bonnin-Jusserand et al. 2019). Furthermore, fishes caught in shallow waters adjacent to coastal areas, where marine and fresh waters converge, may be infected by bacteria from human sources, such as *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* (Feliatra et al. 2020).

Bacteria of the genus *Staphylococcus* can be transmitted by fish, but unlike the genus *Vibrio*, they are not typical of marine environments and are thus not considered autochthonous (Romero-Jarero and Negrete-Redondo 2011). In addition, *Vibrio* species such as *V. cholerae* and *V. parahaemolyticus*, which are present in aquatic ecosystems, are recognized for causing gastrointestinal tract infections in humans with high resistance to antibiotics (Bonnin-Jusserand et al. 2019). Other bacteria have also been identified in fish, such as *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter* spp., *Salmonella* Paratyphi A and B, *Salmonella* Enteritidis, *Clostridium botulinum*, *Enterobacter* spp., *Serratia* ssp., *Enterococcus faecalis*, and *Staphylococcus epidermidis* (Romero-Jarero and Negrete-Redondo 2011).

In Nicaragua, there are no microbiological studies on marine fishes. Therefore, the aim of this study was to identify *Vibrio* spp. and other pathogenic bacteria in fishes from 4 communities on the Pacific coast of Nicaragua. This is the first study describing the frequency of bacteria in fishes landed by artisanal fisheries in Nicaragua.

MATERIALS AND METHODS

Sampling

The study was carried out in 4 fishing communities (El Tránsito: 12°04'24"N, 86°72'21"W; Las Peñitas: 12°34'28"N, 87°02'38"W; Poneloya: 12°37'10"N, 87°06'00"W; Jiquilillo: 12°72'48"N, 87°45'86"W) on the western Pacific coast of Nicaragua, between October and November 2019. A total of 62 samples were analyzed and they were distributed in proportion to the number of fishes caught per community: 31 fishes from the Jiquilillo community, 13 fishes from El Tránsito, 10 fishes from Las Peñitas, and 8 fishes from Poneloya (Fig. 1). The fish species analyzed were *Lutjanus colorado* ($n = 18$),

animal y otros nutrientes, sino que también genera empleos e ingresos para satisfacer otras necesidades (FAO 2014). La pesca a pequeña escala en el lado del Pacífico del país se ha concentrado en la captura de pargos (*Lutjanus* spp.), meros (*Epinephelus striatus*), lisas (*Mugil* spp.), palometas (*Brama brama*) y corvinas (*Cynoscion* spp.) (FAO 2018). No obstante, la intensificación de la actividad pesquera se ha visto acompañada del aumento de enfermedades emergentes y reemergentes (Ghaly et al. 2010).

Los peces de las especies *Lutjanus guttatus* o *Mugil cephalus* capturados del medio natural pueden albergar bacterias patógenas, tales como *Aeromonas* spp., *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* (Gomez-Gil et al. 2007, Hassen et al. 2020), por lo que podrían ser considerados un reservorio o un vehículo de infecciones transmitidas por los alimentos y, por consiguiente, una amenaza para la salud pública (Bonnin-Jusserand et al. 2019). Además, los peces capturados en aguas poco profundas adyacentes a las zonas costeras, donde las aguas marinas y dulces coinciden, pueden estar infectados por bacterias de procedencia humana, como *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* (Feliatra et al. 2020).

Las bacterias del género *Staphylococcus* pueden ser transmitidas por los peces, pero a diferencia del género *Vibrio*, no son propias del ambiente marino, por lo que no se consideran autóctonas (Romero-Jarero y Negrete-Redondo 2011). Además, las especies del género *Vibrio* como *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus*, presentes en ecosistemas acuáticos, son causantes de infecciones del tracto gastrointestinal en humanos con alta resistencia a los antibióticos (Bonnin-Jusserand et al. 2019). En los peces también se han identificado bacterias como *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter* spp., *Salmonella* Paratyphi A y B, *Salmonella* Enteritidis, *Clostridium botulinum*, *Enterobacter* spp., *Serratia* ssp., *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus epidermidis* (Romero-Jarero y Negrete-Redondo 2011).

En Nicaragua no existen estudios microbiológicos en peces marinos. Por ello, el objetivo de este estudio fue identificar *Vibrio* spp. y otras bacterias patógenas en peces procedentes de 4 comunidades en la costa del Pacífico de Nicaragua. Este es el primer estudio que describe la frecuencia de bacterias en peces procedentes de la pesca artesanal en Nicaragua.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

El estudio se realizó en 4 comunidades pesqueras (El Tránsito: 12°04'24"N, 86°72'21"W; Las Peñitas: 12°34'28"N, 87°02'38"W; Poneloya: 12°37'10"N, 87°06'00"W; Jiquilillo: 12°72'48"N, 87°45'86"W) en la costa del Pacífico de Nicaragua, de octubre a noviembre de 2019. Se analizaron 62 muestras, las cuales fueron distribuidas en proporción a la cantidad de peces capturados por comunidad, de forma que

Caranx latus (n = 14), *M. cephalus* (n = 13), *B. brama* (n = 9), and *Pomadasyss* spp. (n = 8).

An external assessment of the fishes was made for macroscopic lesions such as bleeding in the skin, fins, and gills; ulcers; blisters; and peeling. Relevant variables were recorded: fish species, capture time (data provided by the fisherman), origin (coordinates), and weight. The samples were individually introduced in sterile bags without any additive and were transported in a portable cooler with refrigerant packs at temperatures between 4 and 8 °C for immediate processing (less than 1 h) in the Laboratorio de Microbiología Veterinaria at the Centro Veterinario de Diagnóstico e Investigación, Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinarias, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León.

Bacteriological analysis

Determination of Vibrio load

Fish surfaces were cleaned with 95% alcohol, and the necropsy was performed using a sterile scalpel. A 1-g portion of the dorsal muscle was weighed aseptically; it was homogenized with 9 mL of sterile peptone water (SPW) using a mortar (previously sterilized at 160 °C for 1 h) and a vortex mixer (Fisherbrand; Waltham, MA, USA) for 2 min. Immediately afterwards, serial tenfold dilutions were made from the first mixture, adding 9 mL of SPW plus 1 mL of the previous mixture, in such a way that the dilutions 1:10, 1:100, 1:1,000 were obtained. Then, 100 µL of each dilution were plated on thiosulphate-citrate-bile

se incluyeron 31 peces de la comunidad Jiquilillo, 13 peces de El Tránsito, 10 peces de Las Peñitas y 8 peces de Poneloya (Fig. 1). Las especies de peces analizadas fueron *Lutjanus colorado* (n = 18), *Caranx latus* (n = 14), *M. cephalus* (n = 13), *B. brama* (n = 9) y *Pomadasyss* spp. (n = 8).

Se realizó una examinación externa de los peces en busca de lesiones macroscópicas como hemorragias en la piel, aletas y branquias; úlceras; ampollas; y descamaciones. Se recolectó información de variables como especie del pez, hora de captura (datos proporcionados por el pescador), procedencia (coordenadas) y peso. Las muestras se introdujeron individualmente en bolsas plásticas estériles sin ningún aditivo y fueron transportadas en una nevera portátil con refrigerante a una temperatura de entre 4 y 8 °C para ser procesados inmediatamente (en un tiempo menor que 1 h) en el Laboratorio de Microbiología Veterinaria del Centro Veterinario de Diagnóstico e Investigación, Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinarias, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León.

Análisis bacteriológico

Determinación de la carga de Vibrio

Se limpió la superficie de los peces con alcohol al 95%, y se realizó la necropsia con la ayuda de un bisturí estéril. Se pesó asepticamente 1 g de porción del músculo de la parte dorsal, el cual fue homogenizado con 9 mL de agua de peptona estéril (APE) con ayuda de un mortero (esterilizado previamente a 160 °C durante 1 h) y un mezclador vórtex

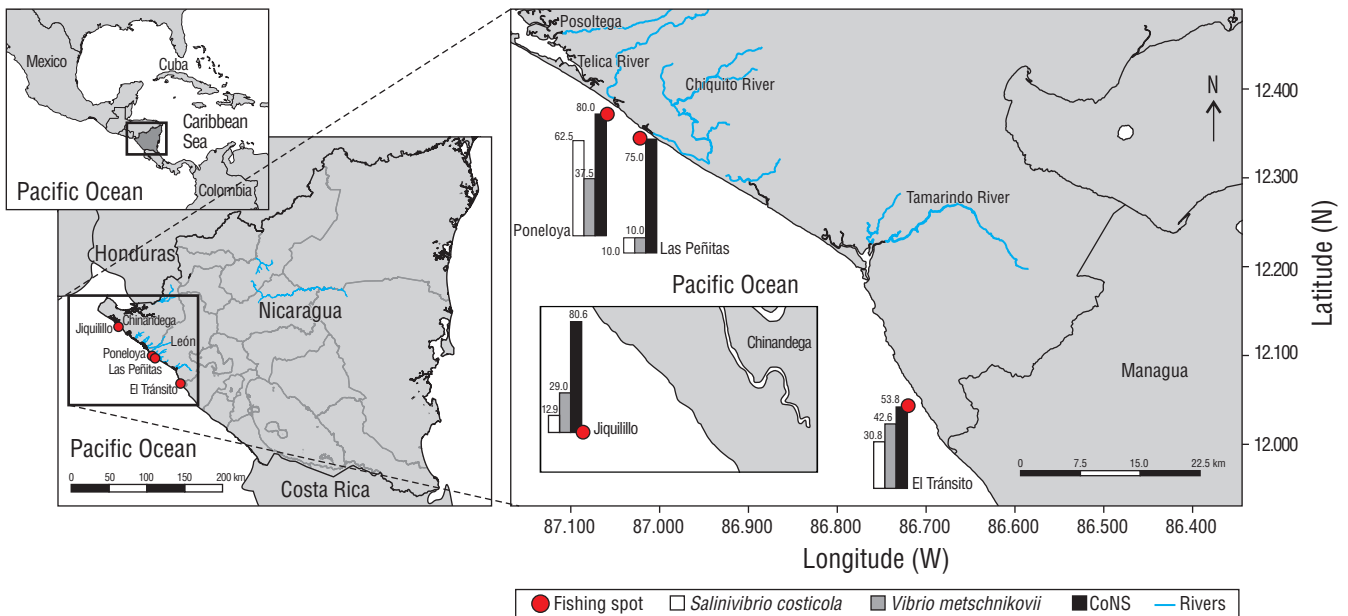


Figure 1. Relative frequency of bacteria isolated from fishes caught in the Pacific Ocean off Nicaragua. CoNS, coagulase-negative staphylococci. **Figura 1.** Frecuencia relativa de bacterias aisladas en los peces capturados en el Pacífico frente a Nicaragua. CoNC, Staphylococcus coagulasa negativa.

salts-sucrose (TCBS) agar plates, which were incubated at 33 °C for 24 h.

Bacteria of the genus *Vibrio* were identified at the species level according to the morphology of the colonies on TCBS agar (color, size, and shape), Gram staining, oxidase test, tolerance to NaCl concentrations (0%, 3%, 8%, and 14% of NaCl), and biochemical tests using the commercial API 20E test (bioMérieux, France).

Isolation of other bacteria

For the isolation of bacteria not belonging to the genus *Vibrio*, serial dilutions were inoculated on trypticase soy agar plates. *Staphylococcus* was identified by the morphology of the colonies and the presence of hemolysis in 5% blood agar, Gram staining, and coagulase and DNase enzymes.

Antibiotic sensitivity test

Resistance profiles for *Vibrio* were determined by the agar diffusion, or Kirby–Bauer, method according to the protocol established by the Clinical Laboratory Standards Institute (Uddin et al. 2018). Briefly, a bacterial suspension was prepared at a concentration of 0.5 McFarland scale, which was then inoculated on Mueller Hinton agar plates using a sterile swab. After 5 min, the discs were impregnated with antibiotics (tetracycline, ciprofloxacin, amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin, and chloramphenicol) and placed on the agar surfaces. The plates were incubated at 37 °C for 18–24 h; inhibition halos were measured; and results were recorded as resistant, intermediate, and sensitive (see Carpenter et al. 2018).

Statistical analysis

The Fisher test was used to compare the presence of bacteria considering the sampled communities and fish species. A one-way analysis of variance (ANOVA) was applied for bacterial loads, assuming normal distribution of the data after the Shapiro–Wilk test. All data were recorded and analyzed in SPSS v.21.

RESULTS

Bacteria with yellow colonies were isolated on TCBS, with a diameter of 2–3 mm, Gram-negative bacilli, and negative growth at 0% (w/v) NaCl concentration and positive at 3%, 8%, and 14% NaCl concentrations. The oxidase, indole, citrate, hydrolysis of H₂S, arginine dihydrolase, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, hydrolysis of urea, arabinose, and gas production tests were negative, whereas the motility, Voges-Proskauer, glucose, inositol, lactose, mannitol, sorbitol, and sucrose tests were positive; these reactions were compatible with those of *Vibrio metschnikovii*, which was found in 30.64% (95% CI: 18.36–42.92) of the

(Fisherbrand; Waltham, MA, EUA) durante 2 min. Inmediatamente después, se realizaron diluciones seriadas de base 10 a partir de la primera mezcla, añadiendo 9 mL de APE más 1 mL de la mezcla anterior, de tal forma que se obtuvieron las diluciones 1:10, 1:100 y 1:1,000. Luego, a volumen de 100 µL, cada dilución fue sembrada en placas de agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) por dispersión, las cuales fueron incubadas a 33 °C durante 24 h.

Las bacterias del género *Vibrio* fueron identificadas a nivel de especie de acuerdo con la morfología de las colonias en agar TCBS (color, tamaño y bordes), la tinción de Gram, la prueba de oxidasa, la tolerancia a concentraciones de NaCl (0%, 3%, 8% y 14% de NaCl) y las pruebas bioquímicas con el kit comercial API 20E (bioMérieux, Francia).

Aislamiento de otras bacterias

Para el aislamiento de bacterias no pertenecientes al género *Vibrio*, las diluciones seriadas fueron sembradas en placas de agar tripticasa de soja. La identificación de *Staphylococcus* se realizó con base en la morfología de las colonias y la presencia de hemólisis en agar sangre al 5%, tinción de Gram y las enzimas coagulasa y DNasa.

Prueba de sensibilidad a antibióticos

Los perfiles de resistencias para *Vibrio* fueron determinados por el método de difusión en agar, o Kirby-Bauer, de acuerdo con el protocolo establecido por el Clinical Laboratory Standards Institute (Uddin et al. 2018). Para ello, se preparó una suspensión bacteriana a una concentración de 0.5 en escala de McFarland, la cual luego fue inoculada en placas de agar Mueller Hinton con ayuda de un hisopo estéril. Después de 5 min, se colocaron en las superficies de agar los discos impregnados con los siguientes antibióticos: tetraciclina, ciprofloxacina, amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina y cloranfenicol. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 18–24 h; los halos de inhibición fueron medidos; y los resultados se registraron como resistente, intermedio y sensible (véase Carpenter et al. 2018).

Análisis estadístico

Se aplicó la prueba de Fisher para comparar la presencia de bacterias respecto a las comunidades muestreadas y las especies de peces. Para las cargas bacterianas, se aplicó el análisis de varianza (ANDEVA) de un factor, bajo el supuesto de distribución normal de los datos según la prueba de Shapiro–Wilk. Todos los datos fueron registrados, almacenados y analizados en SPSS v.21.

RESULTADOS

Se aislaron bacterias con colonias amarillas en TCBS, con un diámetro de 2–3 mm, bacilos Gram negativos y

analyzed fish samples. In addition, green colonies were isolated on TCBS, with a diameter of 2–3 mm, Gram-negative bacilli, and negative growth at 0% and 3% and positive at 8% and 14% NaCl concentrations. In this case, indole, citrate, hydrolysis of H₂S, arginine dihydrolase, lysine decarboxylase, lactose, inositol, sorbitol, ornithine decarboxylase, hydrolysis of urea, arabinose, and gas production tests were negative, whereas the motility tests, Voges-Proskauer, glucose, mannitol, and sucrose tests were positive; these reactions were compatible with those of *Salinivibrio costicola*, which was found in 22.58% (95% CI: 11.37–33.79) of the analyzed fish samples. Gram-positive, coagulase-negative, catalase-positive, and DNase negative cocci bacteria were also isolated, and the characteristics were compatible with those of coagulase-negative staphylococci (CoNS) in 82.30% (95% CI: 71.94–92.57) of the fish samples.

Coinfections of *V. metschnikovii*, *S. costicola*, and CoNS were found in 5/62 samples; and *S. costicola* was exclusively found in 2/14 samples. CoNS was isolated in 33/52 samples (Fig. 2).

A significant difference (χ^2 , $P = 0.032$) was observed in the isolation of *Vibrio* spp. from the muscles of fish from the different communities. Frequencies of positive samples were higher for the Poneloya (5/8) and El Tránsito (8/13) communities and lower for the Las Peñitas (1/10) and Jiquilillo (10/31) communities (Fig. 1).

The positive percentage for *V. metschnikovii* was similar between the analyzed fish species (χ^2 , $P \geq 0.05$), as the lowest percentage was found in *C. latus* (7.10%) and the highest in *Pomadasys* spp. (50.00%). Moreover, the positive percentage for *S. costicola* did not show significant differences

crecimiento negativo en concentraciones de NaCl al 0% (p/v) y positivo en concentraciones de NaCl al 3%, 8% y 14%. Las pruebas de oxidasa, indol, citrato, hidrólisis de H₂S, arginina dihidrolasa, lisina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa, hidrólisis de urea, arabinosa y producción de gas fueron negativas, mientras que las pruebas de motilidad, Voges-Proskauer, glucosa, inositol, lactosa, manitol, sorbitol y sacarosa fueron positivas; estas reacciones fueron compatibles con *Vibrio metschnikovii*, que se encontró en un 30.64% (IC 95%: 18.36–42.92) de las muestras de peces analizadas. Además, se aislaron bacterias con colonias verdes en TCBS, con un diámetro de 2–3 mm, bacilos Gram negativos, y crecimiento negativo en concentraciones de NaCl al 0% y 3% y positivo al 8% y 14%. En este caso, las pruebas indol, citrato, hidrólisis de H₂S, arginina dihidrolasa, lisina descarboxilasa, lactosa, inositol, sorbitol, ornitina descarboxilasa, hidrólisis de urea, arabinosa y producción de gas fueron negativas, mientras que las pruebas de motilidad, Voges-Proskauer, glucosa, manitol y sacarosa fueron positivas; estas reacciones mostraron compatibilidad con *Salinivibrio costicola*, la cual se encontró en un 22.58% (IC 95%: 11.37–33.79) de las muestras de peces analizadas. Se aislaron bacterias cocos Gram positivo, coagulasa negativa, catalasa positiva y DNasa negativa, las cuales fueron compatibles con *Staphylococcus* coagulasa negativa (SCN) en el 82.30% (IC 95%: 71.94–92.57) de las muestras.

En 5/62 muestras se encontraron coinfecciones de *V. metschnikovii*, *S. costicola* y SCN; en 2/14 muestras se encontró exclusivamente *S. costicola*; y en 33/52 muestras se aisló solamente SCN (Fig. 2).

Se observó diferencia significativa (χ^2 , $P = 0.032$) en el aislamiento de *Vibrio* spp. de los músculos de peces procedentes de las diferentes comunidades. Las frecuencias de muestras positivas fueron mayores en las comunidades de Poneloya (5/8) y El Tránsito (8/13) y menores en las comunidades de Las Peñitas (1/10) y Jiquilillo (10/31) (Fig. 1).

El porcentaje positivo a *V. metschnikovii* fue similar entre las especies de peces analizados (χ^2 , $P \geq 0.05$), ya que el porcentaje más bajo se encontró en *C. latus* (7.10%) y el más alto en *Pomadasys* spp. (50.00%). Además, el porcentaje positivo a *S. costicola* no mostró diferencias significativas entre las especies de peces (χ^2 , $P \geq 0.05$), con frecuencias desde un 16.70% en *L. colorado* hasta un 35.80% en *M. cephalus*. El aislamiento de SCN también fue similar entre las especies de peces (χ^2 , $P \geq 0.05$), con frecuencias desde un 61.50% en *M. cephalus* hasta un 94.40% en *L. colorado*.

La carga bacteriana para *S. costicola* fue de 1.58×10^3 UFC·g⁻¹ en las muestras de peces analizadas de la comunidad de Poneloya. Sin embargo, no se observó diferencia significativa respecto a la carga en las muestras de peces de las demás comunidades (ANDEVA, $P = 0.075$). La carga de *V. metschnikovii* fue de 3.50×10^3 UFC·g⁻¹ en las muestras de Las Peñitas y 1.57×10^3 UFC·g⁻¹ en las de Poneloya, mientras que en las muestras de Jiquilillo la carga promedio fue de 7.78×10^2 UFC·g⁻¹ y en las de El

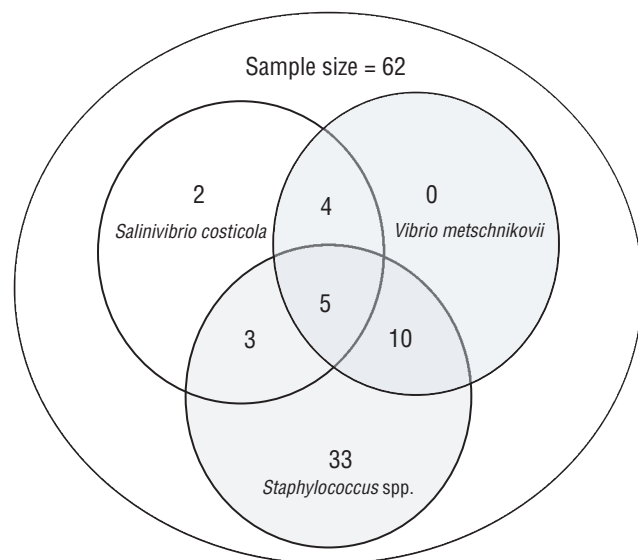


Figure 2. Bacterial coinfections found in fishes caught in the Pacific Ocean off Nicaragua.

Figura 2. Coinfecciones bacterianas encontradas en los peces capturados en el Pacífico frente a Nicaragua.

between fish species (χ^2 , $P \geq 0.05$), with frequencies ranging from 16.70% in *L. colorado* to 35.80% in *M. cephalus*. Isolation of CoNS was also similar between fish species (χ^2 , $P \geq 0.05$), with frequencies ranging from 61.50% in *M. cephalus* to 94.40% in *L. colorado*.

The bacterial load for *S. costicola* was 1.58×10^3 CFU·g⁻¹ in the analyzed fish samples from the Poneloya community. However, no significant difference was observed with respect to the load in fish samples from other communities (ANOVA, $P = 0.075$). The load of *V. metschnikovii* was 3.50×10^3 CFU·g⁻¹ in samples from Las Peñitas and 1.57×10^3 CFU·g⁻¹ in samples from Poneloya, whereas a load of 7.78×10^2 CFU·g⁻¹ was found in samples from Jiquilillo and 5.5×10^2 CFU·g⁻¹ in samples from El Tránsito (ANOVA, $P = 0.024$). The *Vibrio* load in fish samples was 3.9×10^3 CFU·g⁻¹ for Las Peñitas, 2.52×10^3 CFU·g⁻¹ for Poneloya, 9.3×10^2 CFU·g⁻¹ for Jiquilillo, and 5.25×10^2 CFU·g⁻¹ for El Tránsito (ANOVA, $P = 0.003$), regardless of the bacterial species (Table 1).

Regarding macroscopic lesions, the presence of blisters in the operculum was observed in only 9.70% (6/62) of the fishes. *Salinivibrio costicola* was isolated from 4 of the 6 fishes with blisters and from 10 of the 56 fishes without blisters (χ^2 , $P = 0.020$). *Vibrio metschnikovii* was isolated from 2 of the 6 fishes with blisters and from 17 of the 56 fishes without blisters (χ^2 , $P = 0.603$). CoNS isolates were

Tránsito 5.50×10^2 UFC·g⁻¹ (ANDEVA, $P = 0.024$). La carga de *Vibrio*, independientemente de la especie, fue de 3.90×10^3 UFC·g⁻¹ en las muestras de Las Peñitas, 2.52×10^3 UFC·g⁻¹ en las de Poneloya, 9.30×10^2 UFC·g⁻¹ en las de Jiquilillo y 5.25×10^2 UFC·g⁻¹ en El Tránsito (ANDEVA, $P = 0.003$) (Tabla 1).

Respecto a lesiones macroscópicas, solo se pudo evidenciar la presencia de ampollas en el opérculo en un 9.70% (6/62) de los peces. La bacteria *S. costicola* se aisló en 4 de 6 peces con ampollas y en 10 de 56 peces sin ampollas (χ^2 , $P = 0.020$). La bacteria *V. metschnikovii* fue aislada en 2 de 6 peces con ampollas y en 17 de 56 de los peces sin ampollas (χ^2 , $P = 0.603$). El 82.30% (51/62) del total de las muestras presentó crecimiento de SCN. Esta bacteria se aisló en el 89.28% (50/56) de los peces sin ampolla, y su aislamiento fue significativamente menor (χ^2 , $P < 0.01$) en peces con ampolla, ya que solo se encontró en el 16.66% de estos (1/6).

Respecto a la resistencia a los antibióticos, el 100% (14/14) de las cepas de *S. costicola* presentaron resistencia a amoxicilina/ácido clavulánico, pero fueron sensibles a ciprofloxacina y cloranfenicol. Por otro lado, el 100% (19/19) de los aislados de *V. metschnikovii* fueron resistentes a amoxicilina/ácido clavulánico y sensibles a ciprofloxacina, y solo el 84.21% (16/19) mostraron sensibilidad a cloranfenicol (Fig. 3).

Table 1. Bacterial load for the different *Vibrio* species in fishes from the studied communities.

Tabla 1. Carga bacteriana para las diferentes especies de *Vibrio* en los peces de las comunidades estudiadas.

<i>Vibrio</i> species	Communities	N	Mean load (CFU·g ⁻¹)	Standard deviation	P value*
<i>Salinivibrio costicola</i>	El Tránsito	4	2.25×10^2	1.89×10^2	0.075
	Jiquilillo	4	5.75×10^2	4.57×10^2	
	Las Peñitas	1	4.00×10^2	-	
	Poneloya	5	1.58×10^3	1.03×10^3	
<i>Vibrio metschnikovii</i>	El Tránsito	6	5.50×10^2	4.59×10^2	0.024
	Jiquilillo	9	7.78×10^2	7.52×10^2	
	Las Peñitas	1	3.50×10^3	-	
	Poneloya	3	1.57×10^3	1.58×10^3	
<i>Vibrio</i> spp.	El Tránsito	8	5.25×10^2	5.94×10^2	0.003
	Jiquilillo	10	9.30×10^2	6.66×10^2	
	Las Peñitas	1	3.90×10^3	-	
	Poneloya	5	2.52×10^3	1.86×10^3	

*According to the ANOVA test

found in 82.30% (51/62) of total samples. They were found in 89.28% (50/56) of fishes without blisters and in 16.66% (1/6) of fishes with blisters, the latter being significantly lower than the former (χ^2 , $P < 0.01$).

Regarding resistance to antibiotics, 100% (14/14) of *S. costicola* isolates showed resistance to amoxicillin/clavulanic acid but were sensitive to ciprofloxacin and chloramphenicol. On the other hand, 100% (19/19) of *V. metschnikovii* isolates were resistant to amoxicillin/clavulanic acid and sensitive to ciprofloxacin, and only 84.21% (16/19) showed sensitivity to chloramphenicol (Fig. 3).

DISCUSSION

In this study, the Vibrionaceae species found in the fishes caught on the Pacific coast of Nicaragua were *S. costicola* and *V. metschnikovii*. The former is typical of marine environments, with few probabilities of causing diseases in humans due to ingestion; however, the latter species should be considered relevant when investigating foodborne illnesses associated with the consumption of raw or undercooked fish and shellfish (Matté et al. 2007). *Vibrio metschnikovii* has also been found in a variety of seafood (Nsofor et al. 2014) and it is considered a risk to human health, with virulence factors such as hemolysins and verotoxins (Austin 2010). In addition, there are reports of cases associated with wound infections, mainly in patients exposed to the marine environment, suggesting that *V. metschnikovii* could have zoonotic potential (Linde et al. 2004). A case of severe septic shock and cardiac arrest in a patient with *V. metschnikovii* was also reported (Jensen and Jellinge 2014). Vibriosis is a disease with worldwide spread in fish, affecting farmed fish under stress conditions (Martínez-Díaz and Anguas-Vélez 2002).

In this study, *Vibrio* was present in 38.71% of total samples, which is considered moderate when compared to other studies. For instance, a study isolating *Vibrio* spp. from mullets and tilapia in Venezuela obtained a total percentage of 38.9% for *V. parahaemolyticus* and 33.3% for *V. cholerae* (Arévalo et al. 2003). However, another study reported only 5.90% after isolating *V. parahaemolyticus* from 120 fish samples in Lima (Peru) (Aliaga et al. 2010).

In the present study the frequency of samples positive to *Vibrio* was higher for fish from the Poneloya community, although bacterial load was higher in samples from Las Peñitas and Poneloya. Both communities are close to the city of León, a place with high affluence of tourists; in addition, the fishing areas in both communities are close to estuaries, with the mouth of the Chiquito River in Las Peñitas and the mouth of the Telica River in Poneloya. In a study carried out in Chile, these factors were found to possibly influence the bacterial load in fish, as 80.00% of the river discharges in estuarine systems were contaminated as a result of improper handling of pharmaceutical, domestic, and industrial waste, a factor influencing the habitat and the spread of pathogens (Escobar 2002).

DISCUSIÓN

En este estudio, las especies de la familia Vibrionaceae encontradas en peces capturados frente a la costa del Pacífico de Nicaragua fueron *S. costicola* y *V. metschnikovii*. *Salinivibrio costicola* es propia de ambientes marinos, con poca probabilidad de afecciones clínicas en humanos por ingesta; sin embargo, *V. metschnikovii* debe considerarse importante al investigar enfermedades transmitidas por alimentos relacionadas con el consumo de pescados y mariscos crudos o poco cocidos (Matté et al. 2007). Se ha encontrado *V. metschnikovii* en una variedad de alimentos marinos (Nsofor et al. 2014), y se considera un riesgo para la salud humana, con factores de virulencia como hemolisinas y verotoxinas (Austin 2010). Además, existen informes de casos asociados a infecciones de heridas, principalmente en pacientes expuestos al ambiente marino, lo que sugiere que *V. metschnikovii* podría tener potencial zoonótico (Linde et al. 2004). También se reportó un caso de choque séptico severo y paro cardíaco en un paciente con *V. metschnikovii* (Jensen y Jellinge 2014). La vibriosis en sí es una enfermedad que se ha esparcido mundialmente en peces, y ha afectado a peces de cultivo cuando hay presencia de estrés (Martínez-Díaz y Anguas-Vélez 2002).

En este estudio, la presencia de *Vibrio* se detectó en un 38.71% del total de muestras, un porcentaje moderado cuando se compara con otros estudios. Por ejemplo, en un estudio realizado en Venezuela se aisló *Vibrio* spp. a partir de lisas y de tilapias y se obtuvo un porcentaje total de 38.90% para *V. parahaemolyticus* y de 33.30% para *V. cholerae* (Arévalo et al. 2003). Sin embargo, en otro estudio realizado en Lima (Perú) solamente se reportó un 5.90% después del aislamiento de *V. parahaemolyticus* en 120 muestras de peces (Aliaga et al. 2010).

En el presente estudio, la frecuencia de muestras positivas a *Vibrio* fue mayor para peces de la comunidad de Poneloya, aunque la carga bacteriana fue más elevada en las muestras de Las Peñitas y Poneloya. Estas 2 comunidades se encuentran cercanas a León, una ciudad con afluencia turística; además, en ambas, la zona de pesca está próxima a estuarios, con la desembocadura del río Chiquito en Las Peñitas y la del río Telica en Poneloya. En un estudio realizado en Chile se encontró que estos factores pueden influir en la carga bacteriana en los peces, ya que el 80.00% de las descargas de los ríos en los sistemas de esteros estaban contaminados debido a la mala manipulación de desechos farmacéuticos, domésticos e industriales, los cuales influyen en el hábitat y la proliferación de agentes patógenos (Escobar 2002).

Al analizar las lesiones macroscópicas, solo el 9.70% de los peces presentaron ampollas. La presencia de este tipo de lesiones se ha asociado con la presencia y la carga bacteriana de *Vibrio* spp. que pueden causar infecciones en los organismos acuáticos de importancia comercial (Leyton y Riquelme 2008). En este estudio no se encontró asociación entre la presencia de lesiones macroscópicas y el aislamiento

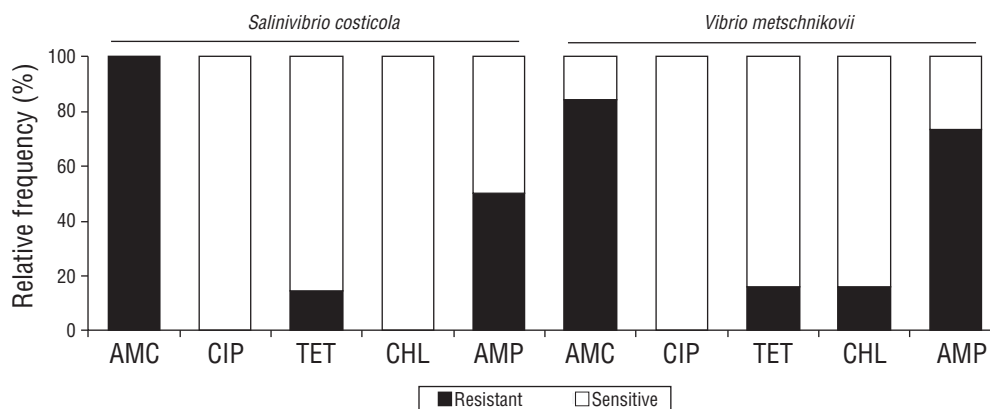


Figure 3. Antimicrobial resistance profiles for the *Vibrio* species found in fishes. AMC, amoxicillin/clavulanic acid; CIP, ciprofloxacin; TET, tetracycline; CHL, chloramphenicol; AMP, ampicillin.

Figura 3. Perfil de resistencia antimicrobiana de las especies de *Vibrio* encontradas en los peces. AMC, amoxicilina/ácido clavulánico; CIP, ciprofloxacina; TET, tetraciclina; CHL, cloranfenicol; AMP, ampicilina.

The analysis of macroscopic lesions showed that only 9.70% of fishes had blisters. This type of lesion has been associated with the presence and bacterial load of *Vibrio* spp. that can cause infections in commercially important aquatic organisms (Leyton and Riquelme 2008). In this study, no association was found between the presence of macroscopic lesions and the isolation of *Vibrio*. This could be related to the fact that, although many species belonging to the genus *Vibrio* are present throughout the marine environment and induce diseases in marine fish, disease outbreaks only occur when fish are stressed; therefore, this association is more likely to be observed in farmed fish than in those obtained from artisanal fishing (Martínez-Díaz and Anguas-Vélez 2002, Hashiem-Mohamed et al. 2016, Mahmoud et al. 2017).

The presence of CoNS in fish can be associated with anthropogenic contamination from the discharge of sewage high in fecal material into the estuaries, which distribute water to the open sea. It should be considered that the analyzed fishes were collected directly from the boats, so there was not much manipulation by the fishermen; that is, it is likely that the fishes were contaminated in their natural environment, as shown in a study carried out in Mexico, where authors detected Streptococcaceae, Micrococcaceae, and *Staphylococcus* in freshly caught fish (Romero-Jarero and Negrete-Redondo 2011).

Regarding the antimicrobial resistance profiles in the genus *Vibrio*, resistance was high, mainly to amoxicillin/clavulanic acid. The way in which various antibiotics reach the oceans is presumably through the discharge of shrimp farm effluents into the oceans; although antibiotic use has been restricted because of the impact it has on the environment, antibiotics are still used to treat bacterial diseases, promoting the development of antibiotic resistant strains (Divyashree et al. 2020). A study on shrimp farming carried out in Mexico highlighted that the use of antibiotics has produced high resistance profiles in bacteria and promoted

de *Vibrio*. Esto se puede deber a que, aunque muchas especies pertenecientes al género *Vibrio* están presentes en todas partes del medio marino e inducen enfermedades en peces marinos, los brotes de enfermedades solo ocurren cuando los peces están estresados, por lo que es más probable observar esta asociación en peces cultivados que en aquellos obtenidos de la pesca artesanal (Martínez-Díaz y Anguas-Vélez 2002, Hashiem-Mohamed et al. 2016, Mahmoud et al. 2017).

La presencia de SCN en los peces se puede asociar a la contaminación antropogénica por las descargas de aguas servidas con alto contenido de material fecal en los esteros, los cuales distribuyen el agua a mar abierto. Se debe tomar en cuenta que los peces analizados fueron recogidos directamente de las lanchas, por lo que no hubo mucha manipulación por los pescadores; es decir, es probable que los peces se hayan contaminado en su medio natural, tal como lo demostró un estudio realizado en México, donde se detectaron Streptococcaceae, Micrococcaceae y *Staphylococcus* en peces recién capturados (Romero-Jarero y Negrete-Redondo 2011).

En relación con los perfiles de resistencia antimicrobiana en el género *Vibrio*, se encontró una alta resistencia, principalmente para amoxicilina/ácido clavulánico. Se considera que la manera en que diversos antibióticos alcanzan los océanos es por medio de la descarga de los efluentes de granjas camaroneras en los océanos; aunque el uso de antibióticos se ha venido restringiendo por el impacto que provocan en el ambiente, aún son utilizados para tratar enfermedades de origen bacteriano, lo que promueve el desarrollo de cepas resistentes a los antibióticos (Divyashree et al. 2020). Un estudio realizado en México sobre la camaricultura destacó que el uso de los antibióticos ha generado un alto perfil de resistencia en las bacterias y ha promovido la persistencia de antibióticos en el medio acuático (Santiago et al. 2009). En algunas regiones, los estuarios son altamente productivos y sirven como importantes áreas de producción

antibiotic persistence in aquatic environments (Santiago et al. 2009). In some regions, estuaries are highly productive and serve as important aquaculture production areas, and since the use of antibiotics is widespread in aquaculture, shellfish harvested from these areas are expected to be contaminated with bacteria harboring resistance genes (Kumar et al. 2005).

In conclusion, *S. costicola*, *V. metschnikovii*, and CoNS were isolated from fish from the Poneloya, Las Peñitas, Jiquilillo, and El Tránsito communities. *Salinivibrio costicola* is typical of marine environments and does not represent health risks, but *V. metschnikovii* causes diseases through the consumption of raw or undercooked fish. CoNS can also cause diseases and it is an indicator of anthropogenic contamination.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the fishermen in the Poneloya, Las Peñitas, Jiquilillo, and El Tránsito communities, who kindly collaborated in the study.

REFERENCES

- Aliaga R, Miranda J, Zevallos J. 2010. Aislamiento e identificación de *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 en pescados y moluscos bivalvos procedentes de un mercado pesquero de Lima, Perú. *Rev Medica Herediana*. 21(3):139–145. <https://doi.org/10.20453/rmh.v21i3.1123>
- Arévalo Z, Clavijo AM, Rolo de M, Álvarez M, Conroy D, Infante D, Santander J. 2003. Aislamiento de *Vibrio cholerae* a partir de lisas y tilapias en Venezuela. *Rev Soc Venez Microbiol*. 23:127–130.
- Austin B. 2010. Vibrios as causal agents of zoonoses. *Vet Microbiol*. 140(3–4):310–317. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.015>
- Bonnin-Jusserand M, Copin S, Le Bris C, Brauge T, Gay M, Brisabois A, Grard T, Midelet-Bourdin G. 2019. *Vibrio* species involved in seafood-borne outbreaks (*Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*): Review of microbiological versus recent molecular detection methods in seafood products. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 59(4):597–610. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1384715>
- Carpenter DE, Anderson K, Citron DM, Dzink-Fox JL, Hackel M, Jenkins SG, Knapp C, Koeth L, Schuetz AN, Wexler H. 2018. *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria*. 9th ed. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute. 47 p.
- Divyashree M, Vijaya Kumar D, Ballamoole KK, Shetty AV, Chakraborty A, Karunasagar I. 2020. Occurrence of antibiotic resistance among Gram negative bacteria isolated from effluents of fish processing plants in and around Mangalore. *Int J Environ Health Res*. 30(6):653–660. <https://doi.org/10.1080/09603123.2019.1618799>
- Escobar J. 2002. La contaminación de los ríos y sus efectos en las áreas costeras y el mar. Santiago de Chile (Chile): Naciones Unidas, Comisión Económica para América Latina y el Caribe [United Nations, Economic Commission for Latin America and the Caribbean]. 63 p.
- [FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2014. Contribución de la pesca y la acuicultura a la seguridad alimentaria y el ingreso familiar en Centroamérica. Panamá: FAO. 107 p.
- [FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2018. Perfiles sobre la pesca y la acuicultura por países: La República de Nicaragua. [place unknown]: FAO: [accessed 2020 Nov 19]. <http://www.fao.org/fishery/facp/NIC/es>.
- Feliatra F, Nursyirwani N, Zirna AP, Lukistyowati I, Mulyadi A, Adelina A. 2020. Antibacterial potential of heterotrophic bacteria isolated in Siak River estuary, Indonesia, against pathogens in fish. *AAFL Bioflux*. 13(3):1585–1594.
- Ghaly AE, Dave D, Budge S, Brooks MS. 2010. Fish spoilage mechanisms and preservation techniques: Review. *Am J Appl Sci*. 7(7):859–877. <https://doi.org/10.3844/ajassp.2010.859.877>
- Gomez-Gil B, Fajer-Avila E, García-Vargas F. 2007. Vibrios of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* Steindachner, 1869 from northwestern Mexico. *J Appl Microbiol*. 102(6):1518–1526. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03199.x>
- Hashiem-Mohamed M, Khalifa E, El-Sherry YM. 2016. Detection of bacterial infections in some Red Sea fish in Hurghada. *J Mar Biol Oceanogr*. 5(4). <https://doi.org/10.4172/2324-8661.1000164>
- Hassen B, Jouini A, Elbour M, Hamrouni S, Maaroufi A. 2020. Detection of Extended-Spectrum β -Lactamases (ESBL) producing Enterobacteriaceae from fish trapped in the lagoon area of Bizerte, Tunisia. *BioMed Res Int*. 2020(7132812):1–9. <https://doi.org/10.1155/2020/7132812>
- Jensen J, Jelling ME. 2014. Severe septic shock and cardiac arrest in a patient with *Vibrio metschnikovii*: a case report. *J Med Case Reports*. 8:348. <https://doi.org/10.1186/1752-1947-8-348>
- Kumar HS, Parvathi A, Karunasagar I, Karunasagar I. 2005. Prevalence and antibiotic resistance of *Escherichia coli* in tropical seafood. *World J Microbiol Biotechnol*. 21:619–623. <https://doi.org/10.1007/s11274-004-3555-8>
- Leyton Y, Riquelme C. 2008. Vibrios en los sistemas marinos costeros = Vibrios in the marine coastal systems. *Rev Biol Mar Oceanogr*. 43(3):441–456. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572008000300004>
- Linde H-J, Kobuch R, Jayasinghe S, Reischl U, Lehn N, Kaulfuss S, Beutin L. 2004. *Vibrio metschnikovii*, a rare cause of wound

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a los pescadores de las comunidades Poneloya, Las Peñitas, Jiquilillo y El Tránsito, que gentilmente colaboraron con el estudio.

- infection. J Clin Microbiol. 42(10):4909–4911.
<https://doi.org/10.1128/JCM.42.10.4909-4911.2004>
- Mahmoud MM, Sayed-Hassan E, Nour-El-Deen EA, Haridy M, El-Moghny-Salem FA, Abdel-Rahman Mohamed M. 2017. Bacterial infections in some Red Sea fishes. Assiut Vet Med J. 63(155):86–93.
- Martínez-Díaz SF, Anguas-Vélez B. 2002. Incidence of *Vibrio* during dermal and systemic infections of the spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus* Steindachner: 1868) in captivity = Incidencia de *Vibrio* durante infecciones dérmicas y sistémicas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus* Steindachner: 1868) en cautiverio. Cienc Mar. 28(4):347–356.
<https://doi.org/10.7773/cm.v28i4.240>
- Matté MH, Baldassi L, Barbosa ML, Malucelli MIC, Nitrini SMOO, Matté GR. 2007. Virulence factors of *Vibrio metschnikovii* strains isolated from fish in Brazil. Food Control. 18(6):747–751.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.03.012>
- Nsofor CA, Kemajou ST, Nsofor CM. 2014. Incidence and antibiotic susceptibility pattern of *Vibrio* species isolated from sea foods sold in Port-Harcourt, Nigeria. J Bacteriol Res. 6:13–16.
<https://doi.org/10.5897/JBR2013.0121>
- ProNicaragua. 2019. Guía del inversionista 2019. [Nicaragua]: Investment Promotion Agency. 70 p.
- Romero-Jarero JM, Negrete-Redondo MP. 2011. Presencia de bacterias Gram positivas en músculo de pescado con importancia comercial en la zona del Caribe mexicano. Rev Mex Biodivers. 82(2):599–606.
<https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2011.2.465>
- Santiago ML, Espinoza A, Bermudez MDC. 2009. Use of antibiotics in culture shrimp. Rev Mex Cienc Farm. 40:22–32.
- Uddin ME, Akter T, Sultana P, Sultana P, Hasan MI, Lubna MA, Monem HA, Parvez MAK, Nahar S, Khan MS. 2018. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility profile analysis of *Vibrio cholerae* O1 from stool samples of Bangladesh. Adv Microbiol. 8(3):188–196.
<https://doi.org/10.4236/aim.2018.830>

Received 9 October 2020,
accepted 28 January 2021.