



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

SUSCEPTIBILIDAD DE LAS FASES INICIALES DE VIDA DE  
LA CABRILLA SARDINERA *Mycteroperca rosacea* A LA  
INFECCIÓN EXPERIMENTAL POR *Aeromonas hydrophila*

## **TESIS**

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en Acuicultura)

Presenta

**María Elena Gómez Rojo**

La Paz, Baja California Sur, agosto de 2007.

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S.; siendo las 13:00 horas del día 24 del Mes de agosto del 2007, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"Susceptibilidad de las fases iniciales de vida de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosaceae* a la infección experimental por *Aeromonas hydrophila*"**

Presentada por la alumna:

Q.B.P. María Elena Gómez Rojo

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Acuicultura

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

  
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

LA COMISION REVISORA

  
Dr. Vicente Gracia López

DIRECTOR DE TESIS

CO-TUTOR

  
Dra. María Antonia Guzmán Murillo

CO-TUTORA

  
DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES,  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

### **Comité Tutorial**

Director de tesis: Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Co-Tutor: Dr. Vicente Gracia López

Co-Tutora: Dra. María Antonia Guzmán Murillo

### **Comité Revisor**

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Dr. Vicente Gracia López

Dra. María Antonia Guzmán Murillo

### **Jurado de Examen de Grado**

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Dr. Vicente Gracia López

Dra. María Antonia Guzmán Murillo

Suplente: Dr. Roberto Carlos Vázquez Juárez

## RESUMEN

Se estudio el efecto que causa una cepa de *Aeromonas hydrophila* sobre dos de los periodos iniciales de vida (embrión y juvenil) de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea*. Durante el periodo embrionario se llevo a cabo la infección en las fases de embrión y embrión libre a concentraciones de la bacteria de  $1 \times 10^1$ - $1 \times 10^7$  UFC/ml con el registro de la sobrevivencia y las anormalidades durante el desarrollo; mientras que en el periodo juvenil, los individuos fueron inyectados vía intraperitoneal con las dosis de  $1 \times 10^5$ - $1 \times 10^8$  UFC/ml con el registro de la sobrevivencia, parámetros hematológicos y alteraciones histopatológicas. En el periodo embrionario, en el paso de la fase de embrión a embrión libre no se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de eclosión. Durante la fase de embrión libre y después de 23 horas de haberse infectado, se encontró una menor sobrevivencia significativa a la máxima concentración, con respecto al resto de las concentraciones incluido el control. Además, a este mismo tiempo se determino una  $LC_{50}$  de  $5.37 \times 10^9$  UFC/ml, lo que nos indica que el efecto de la concentración de la bacteria es poco virulento en los embriones libres. Con respecto al periodo juvenil, se determinaron parámetros hematológicos, donde se pudo apreciar que no existe diferencia significativa en la concentración de hemoglobina ni en la cuenta total de leucocitos, aunque de acuerdo al estudio microbiológico, fue posible reaislar la bacteria como cultivo puro, de los órganos infectados con las concentraciones mas altas del inóculo ( $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  UFC/ml). Con base al estudio histopatológico en los cortes de los órganos analizados, a partir de los individuos inoculados con la dosis de  $1 \times 10^5$  UFC/ml, se encontraron alteraciones en el hígado y conforme se incremento la dosis, el daño se presento en el riñón y en el intestino sucesivamente.

## **ABSTRACT**

Studies were made to determine the effect of an *Aeromonas hydrophila* strain for two of the early-life periods (embryo and juvenile) of the leopard grouper *Mycteroperca rosacea*. During the embryo period we infected the embryo and free-embryo phases with bacterial concentrations of  $1 \times 10^1$  to  $1 \times 10^7$  CFU mL<sup>-1</sup> and recorded the survival and abnormality during development. The juvenile fishes were injected intraperitoneally with doses of  $1 \times 10^5$  to  $1 \times 10^8$  CFU ml<sup>-1</sup> and we recorded the survival, hematological parameters and histopathological changes. For the embryo period, the step of embryo to free embryo phase did not show significant differences in the percentage of hatching. During the free embryo phase and 23 h after inoculation, we found lower survival with animals subjected to the highest concentration. We determined the LC<sub>50</sub> to be  $5.37 \times 10^9$  CUF ml<sup>-1</sup>, which indicated to us that the effect of the bacterial concentration is weakly virulent for free embryos. For the juveniles, we determined hematological parameters and found there were no significant differences in the hemoglobin concentration nor the total white-blood-cell count, although by microbiological examination we were to recover the bacterium in pure culture from the infected organs treated with the highest concentrations ( $1 \times 10^7$  and  $1 \times 10^8$  CFU ml<sup>-1</sup>). Based on the histopathological study of the organ sections analyzed, after the juveniles were inoculated with the  $1 \times 10^5$  CFU ml<sup>-1</sup>, were found changes in the liver. When the doses were increased, histological damage was evident in the kidney and in the gut.

## **DEDICATORIA**

### **A mis queridos Padres**

Carlos y Lupita, porque gracias al amor, apoyo y comprensión que siempre se han mostrado como pareja, así como por la dedicación y amor que tuvieron hacia nosotros sus hijos, nos enseñaron que lo más valioso es la familia.

### **A mí amado esposo José Luis**

Por que siempre ha estado conmigo en toda circunstancia y que me ha enseñado a superar los obstáculos con dedicación, optimismo y confianza, pero sobre todo por su amor e infinita paciencia.

### **A mis queridos hijos María José y Luis Enrique**

Quienes son un regalo de Dios y un par de motorcitos que me alientan todos los días a ser mejor.

### **A mis queridos hermanos Carlos, Alejandro, Javier, María Eugenia, Martha, Gabriela y Laura**

Por los buenos momentos que hemos pasado cuando estamos juntos y por su cariño que siempre han tenido hacia mi.

### **A mi cuñada Rocío y a mis sobrinos Ilhui, Javier y Andrés**

Por que siempre he tenido el apoyo familiar en ellos y porque hemos compartido momentos agradables.

**A mis suegros**

Filiberto y Emma por su cariño y el ánimo que siempre me han manifestado en cualquier proyecto que emprendo.

**A mis hermanos políticos Filiberto, Arcelia y Enrique**

Porque en ellos encuentre el apoyo de otra familia.

**A mi Amiga Flor**

Por que a pesar del tiempo y la distancia, nuestra amistad se ha conservado intacta.

**En recuerdo de mi cuñada y comadre Mary (q.e.p.d)**

Por su alegría que siempre mostró ante la vida, por haber sido un ejemplo como madre y esposa y por la confianza que deposito en mi como una gran amiga.

**A mis queridas amigas Claudia Mendoza Santana y Conchita (q.e.p.d)**

Quienes partieron en diferente tiempo pero que coincidieron por la amistad incondicional que me brindaron y por su gran profesionalismo que siempre mostraron.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi director de tesis Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle por el apoyo recibido durante la realización del presente trabajo y por la confianza que siempre depositó en mi. También agradezco a mis cotutores, la Doctora María Antonia Guzmán Murillo por su interés mostrado en el trabajo y por las sugerencias realizadas para mejorarlo, así como al Dr. Vicente Gracia López por las facilidades brindadas en la obtención del material biológico utilizado y por sus comentarios.

Al Instituto Mexicano del Seguro Social, en particular al Dr. Adolfo García González, Coordinador de la Delegación de Investigación en Salud, por hacer las gestiones necesarias en conjunto con la Delegación Sindical para que me otorgaran el permiso con el que pude realizar mis estudios. También quiero agradecer a la Q.F.B. Patricia Razura Torre, Jefa del Laboratorio de Análisis Clínicos por su apoyo y por brindar las facilidades para utilizar equipo y material de laboratorio de las áreas de Hematología y Bacteriología. A mis compañeras Q.F.B. Guadalupe Buelna y la T.L.C. Blanca Geraldo por su apoyo en el área de Bacteriología. A Emilio y a Rodrigo por su ayuda en la preparación de algunos medios de cultivo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste por el apoyo económico otorgado para la realización y culminación de los estudios de Maestría.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Patogénesis Microbiana, en particular a la M. en C. María de Jesús Romero Geraldo, “la Chula”, por la paciencia y buena disposición que siempre mostró para capacitarme y guiarme con algunas técnicas utilizadas. A la M. en C. Martha Reyes Becerril “Martita”, por haber diseñado el sistema cerrado para el



bioensayo con juveniles, así como por su ayuda técnica en la extracción de sangre de los peces juveniles. A la M. en C. Claudia Celina López Bolaños “Claus” por ayudarme a familiarizarme en el uso de los equipos del laboratorio. Al Dr. Roberto Carlos Vázquez Juárez por sus atinados comentarios en los seminarios que se presentó el trabajo.

A la M. en C. Carmen Rodríguez Jaramillo, responsable del Laboratorio de Histología e Histoquímica por su apoyo incondicional, ya que siempre mostró un gran interés en la realización del trabajo y por plantear alternativas para mejorar las técnicas histológicas. A la Técnica Eulalia Meza Chávez por su gran disposición en la asesoría y en el procesamiento de las muestras.

A la M. en C. Norma Angélica Ochoa Alvarez, responsable del Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico por facilitar el espacio para realizar los bioensayos con los embriones y porque siempre me hizo sentir como en casa. A la técnico Ma. Sofía Ramos Galván por su apoyo brindado. También a la M. en C. Roxana Bertha Inohuye Rivera, responsable del Laboratorio de Diagnóstico Parasitológico por su apoyo logístico y por su interés en el desarrollo del trabajo.

A la M. en C. Delia Irene Rojas Posada, responsable del Laboratorio de Genética Molecular por su apoyo técnico y buena disposición para completar el estudio molecular y porque siempre me alentó a seguir adelante.

Al M. en C. Manuel Moreno Legorreta, responsable del laboratorio de Biotoxinas Marinas por su amistad y asesoría brindada para utilizar el fotodocumentador y por su apoyo incondicional y su paciencia para escucharme.

Al Dr. Amauri Cordero Tapia por su amistad y apoyo brindado en la interpretación de las laminillas histológicas de los cortes de los peces juveniles y al Dr. Vladimir Levsky por su ayuda en la interpretación de las imágenes del MEB de embriones y larvas.

A la Dra. Lucía Ocampo Victoria, por su amistad y porque gracias a sus sesiones académicas, comprendí la importancia de la Acuicultura y me permitió enfocar con más claridad mi trabajo.

A los compañeros de la Biblioteca Lic. Ana María Talamantes Cota, Ing. Edgar Yuen Sánchez y al T.C.C. Marco Antonio Díaz Serna por su trato amable y cordial.

Al M. en C. Juan Manuel Martínez Brown por haberme asesorado, ilustrado y apoyado en los bioensayos realizados, especialmente con los embriones y por su ayuda para comprender mas acerca de la ontogenia de los peces. Al M. en C. Víctor Carrasco Chávez por su apoyo en la puesta en marcha del sistema cerrado utilizado para el bioensayo con los juveniles, así como por su asesoría. Al M. en C. José Luis Ortíz Galindo por su asesoría en el diseño experimental, así como por las sugerencias para mejorar el documento de tesis.

## LISTA DE FIGURAS

---

Título	No. de página
Figura 1. Amplificación de ADN con los primers Fw: MR y Re: AV donde se observa el número aproximado de pares de bases correspondiente <i>Aeromonas veroni</i> (A186) y <i>A. hydrophila</i> (Ah-315).	57
Figura 2. Morfología de embriones de <i>Mycteroperca rosacea</i> sometidos a tratamiento control e infectados con la cepa Ah-315 de <i>Aeromonas hydrophila</i> .	62
Figura 3. Mortalidad acumulada de embriones libres de <i>Mycteroperca rosacea</i> , debida a una infección experimental por <i>Aeromonas hydrophila</i> (Ah-315) a diferentes concentraciones.	63
Figura 4. Micrografías de MEB de la superficie de embriones de <i>Mycteroperca rosacea</i> de tratamiento control e infectados con la cepa Ah-315 de <i>Aeromonas hydrophila</i> .	64
Figura 5. Embriones libres de <i>Mycteroperca rosacea</i> eclosionados de embriones infectados con la cepa Ah-315 de <i>Aeromonas hydrophila</i> .	68
Figura 6. Morfología externa de la fase apterolarva de <i>Mycteroperca rosacea</i> eclosionados de embriones infectados con la cepa Ah-315 de <i>Aeromonas hydrophila</i> .	71
Figura 7. Cortes histológicos de la fase apterolarva de <i>Mycteroperca rosacea</i> obtenidas de embriones libres infectados con la cepa Ah-315 de <i>Aeromonas hydrophila</i> .	72
Figura 8. Micrografías de MEB de la epidermis de apterolarvas de <i>Mycteroperca rosacea</i> de tratamiento control e infectados con la cepa Ah-315 de <i>Aeromonas hydrophila</i> .	74
Figura 9. Peces juveniles de <i>Mycteroperca rosacea</i> inoculados con la concentración $1 \times 10^8$ UFC/ml de la cepa Ah-315	77
Figura 10. Porcentaje de sobrevivencia en juveniles de <i>Mycteroperca rosacea</i> durante el bioensayo.	77
Figura 11. Frotis de sangre periférica de juveniles de <i>Mycteroperca rosacea</i> experimentalmente con la cepa Ah-315 de <i>Aeromonas hydrophila</i>	79

---

<b>Título</b>	<b>No. de página</b>
Figura 12. Amplificación de ADN con los primers Fw: MR y Re: AV7	84
Figura 13. Secciones de cortes histológicos del riñón de juveniles de <i>Mycteroperca rosacea</i> infectados con la cepa Ah-315 de <i>Aeromonas hydrophila</i>	85
Figura 14. Secciones de cortes histológicos del hígado de juveniles de <i>Mycteroperca rosacea</i> infectados con la cepa Ah-315 de <i>Aeromonas hydrophila</i> .	87
Figura 15. Secciones de cortes histológicos del intestino anterior de juveniles <i>Mycteroperca rosacea</i> infectados con la cepa Ah-315 de <i>Aeromonas hydrophila</i> .	89

## LISTA DE TABLAS

Título	No. de página
Tabla I. Sustratos bioquímicos contenidos en la tarjeta GNI del equipo automatizado Vitek.	34
Tabla II. Esquema de infección directa en embriones libres de cabrilla sardinera <i>Mycteroperca rosacea</i> infectados con suspensiones de <i>Aeromonas hydrophila</i> .	42
Tabla III. Esquema de inoculación intraperitoneal en juveniles de cabrilla sardinera <i>Mycteroperca rosacea</i> infectados con <i>Aeromonas hydrophila</i> .	43
Tabla IV. Características fenotípicas de la cepa Ah-315 <i>Aeromonas hydrophila</i> .utilizada en el presente trabajo.	58
Tabla V. Porcentaje de eclosión de los embriones sometidos a diferentes concentraciones bacterianas de <i>Aeromonas hydrophila</i> por espacio de 27 horas .	59
Tabla VI. Valores promedio y su desviación estándar obtenidos mediante prueba de Dunnett.	65
Tabla VII. Valores de LC <sub>50</sub> y resumen de los análisis estadísticos obtenidos 23 horas después de la infección.	66
Tabla VIII. Valores promedio de parámetros fisicoquímicos durante el bioensayo con juveniles de <i>Mycteroperca rosacea</i> .	75
Tabla IX. Resultados de hemoglobina (Hb), leucocitos totales y cuenta diferencial de leucocitos en juveniles al finalizar el bioensayo.	80
Tabla X. Cepas reaisladas de riñón, hígado e intestino de los juveniles de cabrilla sardinera.	81
Tabla XI. Características fenotípicas de la cepa Ah-315 <i>Aeromonas hydrophila</i> reaislada de los órganos de los peces infectados.	82
Tabla XII. Frecuencia de la patología por grupo de juveniles de <i>Mycteroperca rosacea</i> , correspondientes a los tratamientos control y a los infectados con la cepa Ah-315 de <i>Aeromonas hydrophila</i> .	90

## CONTENIDO

---

### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

### RESUMEN

### ABSTRACT

### DEDICATORIA

### AGRADECIMIENTOS

### LISTA DE FIGURAS

### LISTA DE TABLAS

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. ANTECEDENTES</b>	7
2.1 LA ONTOGENIA EN LOS PECES	7
2.2 INFECCIONES BACTERIANAS	9
2.3 SISTEMA INMUNE EN PECES	11
2.4 TAXONOMÍA DEL GÉNERO <i>Aeromonas</i>	14
2.5 <i>Aeromonas hydrophila</i>	17
2.5.1 OCURRENCIA	17
2.5.2 CARACTERÍSTICAS	18
2.5.3 PATOLOGÍA EN PECES	19
2.5.4 PATOLOGÍA EN HUMANOS	21
2.5.5 FACTORES DE VIRULENCIA EN PECES Y HUMANOS	22
2.6 INFECCIONES EXPERIMENTALES EN LAS FASES INICIALES DE VIDA DE LOS PECES	23
2.7 ESTUDIOS BACTERIOLÓGICOS CON PECES MARINOS EN MÉXICO	29
<b>3. OBJETIVOS</b>	31
3.1 OBJETIVO GENERAL	31
3.2 OBJETIVOS PARTICULARES	31
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	32
4.1 BACTERIA	32
4.2 PREPARACIÓN DE LOS INÓCULOS DE <i>Aeromonas hydrophila</i>	36
4.3 PECES DE ESTUDIO Y SISTEMAS DE EXPERIMENTACIÓN	37

4.3.1 EMBRIONES DE <i>Mycteroperca rosacea</i>	37
4.3.2 JUVENILES DE <i>Mycteroperca rosacea</i>	38
4.4 INFECCIÓN EXPERIMENTAL Y RECOLECCIÓN DE ESPECIMENES	39
4.4.1 PERIODO EMBRIONARIO: FASE DE EMBRIÓN, INFECCIÓN POR EXPOSICIÓN DIRECTA	39
4.4.2 PERIODO EMBRIONARIO: FASE DE EMBRIÓN LIBRE, INFECCIÓN POR EXPOSICIÓN DIRECTA	41
4.4.3 PERIODO JUVENIL: INFECCIÓN INTRAPERITONEAL	43
4.4.3.1 HEMATOLÓGICOS	44
4.4.3.2 MICROBIOLÓGICOS	46
4.4.3.3 HISTOPATOLÓGICOS	48
4.5 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS	49
4.5.1 PROCESO HISTOLÓGICO	49
4.5.1.1 FASE DE EMBRIÓN, EMBRIÓN LIBRE Y APTEROLARVA	49
4.5.1.2 PERIODO JUVENIL: ÓRGANOS RIÑÓN, HÍGADO E INTESTINO	51
4.5.1.3 INTERPRETACIÓN HISTOLÓGICA	52
4.5.2 EVALUACIÓN POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	53
4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	55
4.6.1 PERIODO EMBRIONARIO: FASE DE EMBRIÓN	55
4.6.2 PERIODO EMBRIONARIO: FASE DE EMBRIÓN LIBRE	55
4.6.3 PERIODO JUVENIL	56
<b>5. RESULTADOS</b>	57
5.1 PUREZA DE LA CEPA UTILIZADA EN LOS DIFERENTES BIOENSAYOS.	57
5.2 INFECCIONES EXPERIMENTALES	59
5.2.1 PERIODO EMBRIONARIO: FASE DE EMBRIÓN	59
5.2.1.1 TASA DE ECLOSIÓN	59
5.2.1.2 CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (LC <sub>50</sub> )	60

5.2.1.3 HISTOLOGÍA DE LA FASE DE EMBRIÓN	60
5.2.1.4 ULTRAESTRUCTURA DE LA FASE DE EMBRIÓN	60
5.2.2 FASE DE EMBRION LIBRE	63
5.2.2.1 MORTALIDAD ACUMULADA	63
5.2.2.2 CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (LC <sub>50</sub> )	65
5.2.2.3 EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE LA FASE DE EMBRIÓN LIBRE	66
5.2.2.4 ULTRAESTRUCTURA DE LA FASE DE EMBRIÓN LIBRE	67
5.2.2.5 MORFOLOGÍA EXTERNA DE APTEROLARVAS	69
5.2.2.6 HISTOLOGÍA DE APTEROLARVAS	69
5.2.2.7 ULTRAESTRUCTURA DE APTEROLARVAS	73
5.2.3 PERIODO JUVENIL	73
5.2.3.1 ESTABILIZACIÓN DEL SISTEMA DE CIRCULACIÓN CERRADA	73
5.2.3.2 INFECCIÓN CON <i>Aeromonas hydrophila</i>	76
5.2.3.2.1 COMPORTAMIENTO	76
5.2.3.2.2 SIGNOS	76
5.2.3.2.3 PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA Y CONCENTRACIÓN LETAL AL 50% ( LC <sub>50</sub> )	78
5.2.3.2.4 PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS	78
5.2.3.3 REAISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LA BACTERIA	80
5.2.3.3.1 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA	81
5.2.3.3.2 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	83
5.2.3.3.3 DAÑO HISTOPATOLÓGICO	84
5.2.3.3.3.1 RIÑÓN	84
5.2.3.3.3.2 HÍGADO	86
5.2.3.3.3.3 INTESTINO	88



<b>6. DISCUSIÓN</b>	91
<b>7. CONCLUSIONES</b>	97
<b>8. LITERATURA CITADA</b>	99

## 1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una de las industrias que más ha crecido debido al constante aumento en la demanda de alimento, ya que paso del 3.9% de la producción total en peso en 1970 al 29.9% en 2002 (FAO, 2004). En particular la acuicultura de peces marinos, es una actividad que a nivel mundial ha crecido en la última década mas del 10% y particularmente en la región del Mediterráneo de 1992 a 2001, se tuvo un incremento del 651.1% (Basurco, 2004).

En el mundo, el cultivo de peces marinos es dominado por *Salmo salar*, con Noruega como país productor líder, seguido por Chile, Gran Bretaña, Canadá e Irlanda. Otros peces marinos comercialmente importantes, en países europeos del Mediterráneo como Grecia, Italia, Francia, España y Portugal, son *Sparus aurata*, *Dicentrarchus labrax* y *Psetta maxima*. Así como las especies *Seriola quinqueradiata*, *Plecoglossus altivelis*, *Paralichthys olivaceus* y *Pagrus major* en Japón (FAO, 2004).

La domesticación de una nueva especie, necesariamente involucra el control de enfermedades (Bergh *et al.*, 2001). La aparición y desarrollo de enfermedades en los peces, ha sido el resultado de la interacción entre patógenos, hospedero y ambiente, por lo que en la medida que conozcamos mejor esta interacción, estaremos en mejores condiciones de aplicar las medidas adecuadas para prevenir y controlar las enfermedades que limitan la producción.

Sin embargo, se debe considerar que las condiciones de cultivo pueden estresar a los organismos cultivados, favoreciendo el surgimiento de enfermedades, las que generalmente ocasionan importantes pérdidas económicas, retrasos en los tiempos estimados de cosecha

y gran impacto en el medio ambiente (Walters y Plumb, 1980; Robertson *et al.*, 1987; Murray y Peeler, 2005; Whali *et al.*, 2005).

Se considera que el estrés que se provoca al mantener peces bajo condiciones de cultivo intensivo, es uno de los factores que predispone los peces a infecciones y favorece la presencia de epizootias causadas por bacterias oportunistas, entre otras las del género *Aeromonas* (Camus *et al.* 1998; Cipriano, 2001).

Las especies del género *Aeromonas* típicamente son bacterias acuáticas y algunas veces patógenos de peces, así como de vertebrados de sangre fría que habitan ambientes húmedos, tales como ranas, tortugas y cocodrilos (Glorioso *et al.*, 1974; Rigney *et al.*, 1978; Gorden *et al.* 1979; Pasquale *et al.*, 1994). Además, las especies de este género han emergido como un problema de salud pública para la población humana, ya que provocan infecciones intestinales y extra-intestinales (Janda, 2001), así como por haber sido aisladas de varios alimentos frescos de origen animal, como mariscos, leche bronca, res, puerco, carnero y pollo (Krovacek *et al.* 1992; Rose y Okrend, 1998; Mano *et al.* 2000; Vivekanandhan *et al.*, 2005).

Dentro de las especies de *Aeromonas*, *A. hydrophila* es la especie típica y habitual, se trata de un microorganismo con una fuerte presencia en agua dulce y representa el clásico ejemplo de un patógeno secundario oportunista, cuya acción casi siempre esta provocada por un problema asociado a la calidad del agua o a un error grave en el manejo productivo (Padrós y Furones, 2003).

No obstante, es importante considerar que debido a que las enfermedades clásicas consideradas como típicas de la acuicultura de peces dulceacuícolas, como la furunculosis (*Aeromonas salmonicida*), la enfermedad bacterial del riñón (*Renibacterium*

*salmoninarum*) y algunos tipos de estreptococosis son hoy también problemas importantes en el cultivo de peces marinos (Toranzo *et al.*, 2005), se debe prever la presencia de bacterias supuestamente dulceacuícolas en sistemas intensivos de producción de semilla de peces marinos, como ha ocurrido en el Mediterráneo con especies como *Dicentrarchus labrax* y *Puntazzo puntazzo* (Doukas *et al.*, 1998; Athanassopoulou *et al.*, 1999).

El aislamiento de *A. hydrophila* de muestras de agua y de fuentes alimenticias, aunado al incremento de la resistencia de esta bacteria a los antibióticos y a la cloración del agua (Krovacek *et al.*, 1992b; Legnani *et al.*, 1998; Fernández *et al.*, 2000; Saavedra *et al.*, 2004), además de mantener su patogenicidad al pasar del estado viable pero no cultivable al estado cultivable, después de estar expuesta al agua de mar y bajas temperaturas (Maalej *et al.*, 2004), es que representa una verdadera amenaza a la salud pública. En nuestro país, la bacteria ha sido aislada de muestras clínicas, así como de muestras de agua y de pescado congelado en la ciudad de México (Castro-Escarpulli *et al.*, 2003a, b), incluso se han aislado cepas de *Aeromonas hydrophila* de muestras clínicas, del ambiente y de alimentos, que presentan antígenos característicos de resistencia a antibióticos (Arteaga-Garibay *et al.*, 2006). Además con respecto a Baja California Sur, existe una situación preocupante, ya que el problema que causa la presencia de cepas de *Aeromonas hydrophila* como agente etiológico de enfermedades intestinales a bañistas en aguas recreativas costeras de la parte sur de California, ha sido documentado por Ardi (2005).

En el caso de los peces marinos, para que la actividad sea económicamente rentable, se requiere contar con una producción controlada de semilla en condiciones plenas de salud, la cual por lo regular se obtiene utilizando sistemas intensivos.

Esto conlleva la necesidad de un buen manejo de las condiciones sanitarias, de forma particular en los periodos iniciales de vida (embrión, larva y juvenil), que son los mas susceptibles a las infecciones bacterianas, ya que durante las distintas etapas de la producción de semilla, como son la incubación de huevos y la cría larval hasta su transformación al juvenil, se pueden presentar complicaciones patológicas de origen bacteriano que han arrojado pérdidas económicas cuantiosas para la actividad. (Olafsen, 2001). Los agentes patógenos descritos en los sistemas de cultivo, usualmente se presentan en poblaciones silvestres de peces. Sin embargo, en ambientes naturales, raramente causan mortalidad debido a la falta de las condiciones de estrés que usualmente ocurren en las instalaciones de cultivo.

Por consiguiente, un buen programa integral del manejo sanitario de las diferentes etapas de producción de semilla de peces marinos, pretende lo siguiente: 1) que se logre un número máximo de embriones eclosionados; 2) que las larvas iniciales sobrevivan y crezcan bien; 3) que se produzcan juveniles inmunologicamente preparados para ser introducidos a los ambientes naturales donde se encuentran las instalaciones de engorda; 4) que los juveniles que sean liberados al medio natural, no comprometan la salud de los peces silvestres.

Este tipo de programas, requieren de estudios microbiológicos, como los realizados en algunas especies con potencial acuacultural, tales como, *Centropomus undecimalis* (Kennedy *et al.*, 1998), *Hippoglossus hippoglossus* (Bergh *et al.*, 2001), *Paralichthys dentatus* (Eddy y Jones, 2002), *Diplodus sargus* (Golomazou *et al.*, 2006) y algunas especies de peces gadoideos (Bricknell *et al.*, 2006).

En México, el cultivo de peces marinos se encuentra a nivel experimental, aunque se prevé un crecimiento acelerado en los próximos años. Hasta la fecha, con especies que tienen un potencial acuacultural se ha logrado la maduración y el desove espontáneo bajo el régimen fototérmico de *Paralabrax maculatofasciatus* (Rosales-Velásquez *et al.*, 1992), así como la maduración y la ovulación inducida por medio de manipulación hormonal y el desove artificial con masaje abdominal de varias especies, tales como *Sphoeroides annulatus* (Duncan *et al.*, 2003a, b), *Lutjanus peru* (Dumas *et al.*, 2004) y *Mycteroperca rosacea* (Gracia-López *et al.*, 2004, 2005). A pesar de estos logros, aun no se tiene una producción comercial de alguna especie de pez marino nativo en nuestro país.

No obstante, una de las especies que se está estudiando es la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea*, ya que es un candidato potencial en la acuicultura, debido a su alto valor comercial en el mercado regional. En cuanto al desarrollo biotecnológico de la especie, se han tenido algunos avances sobre la producción controlada de larvas y juveniles (Gracia-López *et al.*, 2005).

La cabrilla sardinera es un recurso que tiene gran potencial para su consumo regional y nacional, por lo que se requieren diversos estudios que permitan establecer medidas de control sanitario para prevenir o controlar enfermedades de origen bacteriano durante sus etapas de producción intensiva de semilla, coadyuvando con ello al desarrollo acuacultural de esta especie. Para el control de enfermedades es necesario conocer no sólo la virulencia del agente etiológico, sino también su modo de transmisión y la epidemiología de la enfermedad (Colwell *et al.*, 1986).

Así que, no se debe descartar la presencia de bacterias oportunistas, una vez que la producción de cabrilla sardinera se haga de manera comercial, por lo que es recomendable

probar el efecto de la infección experimental de *Aeromonas hydrophila* sobre las fases iniciales de vida de *Mycteroperca rosacea*, con el fin de prever algún brote de esta bacteria emergente, que tantos problemas de salud pública ha causado en el mundo, debido a que el contagio se da de pez a humano y viceversa.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 LA ONTOGENIA EN LOS PECES**

Para realizar estudios con las distintas fases de vida de los peces, es necesario conocer su ciclo de vida, que comprende desde la activación del núcleo hasta su muerte y que se conoce como ontogenia. La clasificación de la ontogenia, toma como base el comportamiento reproductivo de los peces y considera tres aspectos fundamentales, los cuales son la selección del sitio del desove, si existe o no cuidado de la prole y la selección del tipo de apareamiento (Balon, 1981). A partir de estas características se tienen tres tipos de ontogenia, la ontogenia indirecta, la de transición y la directa. La principal diferencia entre estos tres tipos, consiste en que tan desarrollados están los individuos al momento de la completa absorción del saco vitelino, que por lo general coincide con el inicio de la alimentación exógena.

En el caso de la ontogenia indirecta, una vez que se completa la absorción del saco vitelino, se inicia el periodo larvario, que por lo regular son individuos con un tubo digestivo poco diferenciado. Mientras que en la ontogenia de transición, después de la completa absorción del saco vitelino se inicia el periodo de alevin (característico de la familia Salmonidae), que son individuos con un tubo digestivo diferenciado, aunque aún no tienen completamente formadas las aletas pares e impares. Finalmente en la ontogenia directa, los individuos carecen de periodo larvario y al término del periodo embrionario se inicia el periodo juvenil.

Alrededor del 80% de los peces marinos costeros de los ambientes tropicales y subtropicales presentan ontogenia indirecta, dentro de este grupo se incluyen familias de



peces de importancia acuacultural alimenticios, como Lutjanidae, Carangidae y Serranidae, entre otros (Tucker, 1998).

La nomenclatura que se utilizará para describir la ontogenia indirecta de los peces, toma en cuenta lo establecido por Balon (1984, 2002), donde se consideran los periodos de vida de embrión, larva, juvenil, adulto y senectud. Cada periodo esta separado por límites naturales y cada uno consiste de una secuencia de intervalos saltatorios autorregulados, los cuales están separados por umbrales estabilizados, conocidos como pasos, los que en su conjunto constituyen las fases de vida.

El periodo embrionario, consiste de tres fases: fase de segmentación del huevo, se inicia con la fusión de los gametos y termina antes del cierre del blastoporo; fase de embrión, se inicia después del cierre del blastoporo y finaliza antes de la eclosión del embrión; fase de embrión libre o eleuteroembrión, se inicia después de la eclosión y finaliza antes de la completa absorción del saco vitelino.

El periodo larvario, el cual consiste de dos fases: la fase de larva con pliegue de la aleta o apterolarva, se inicia una vez que finaliza la absorción del saco vitelino y termina antes del inicio de la formación de los radios en las aletas medias; la fase de larva con aleta formada o pterolarva, a partir del inicio de la formación de los radios y termina antes de la completa formación de los elementos de las aletas pares e impares.

El periodo juvenil, se inicia después de la completa formación de las aletas pares e impares y termina antes de que se inicie la maduración de las gónadas. El periodo adulto, a partir del inicio de la maduración de las gónadas y termina antes de que inicie la degeneración de los órganos y los sistemas de los individuos. El periodo de senectud, comprende a partir de que inicia la degeneración de los órganos y los sistemas hasta su muerte.

A los periodos embrionario, larvario y juvenil se le conoce como ontogenia inicial, por lo que las fases que comprenden se conocen como fases iniciales de vida.

## 2.2 INTERACCIONES BACTERIANAS EN LAS FASES INICIALES DE VIDA

La presencia de enfermedades en el cultivo de peces marinos, se debe fundamentalmente a la proliferación de bacterias patógenas oportunistas (Muroga *et al.*, 1987; Nicolas *et al.*, 1989; Munro *et al.*, 1994). Las principales bacterias que pueden presentarse en sistemas acuáticos de cultivo, son las pertenecientes a los géneros *Vibrio*, *Pseudomonas* y *Aeromonas* (Austin y Austin, 1987), de igual forma en los embriones y larvas de peces marinos o en el agua donde son incubados se ha podido detectar la presencia de cepas de estos géneros, mientras que con las técnicas de incubación intensivas de algunos peces marinos, hay un sobrecrecimiento de bacterias, hasta cuatro ordenes de magnitud con respecto a los niveles normales en el mar (Keskin *et al.*, 1994).

La producción intensiva de semilla de varias especies de peces marinos ha revelado relaciones estrechas entre los peces y las bacterias que eventualmente puedan afectar el establecimiento de una microflora mucosa nativa o resultar en el primer paso de una infección (Olafsen, 2001).

El cultivo exitoso de las fases iniciales de vida de varias especies de peces marinos depende del conocimiento que se tenga de las complejas interacciones entre los organismos cultivados y las comunidades bacterianas, las cuales se desarrollan en las superficies mucosas, en el agua del ambiente y en los sistemas de cultivo. Las interacciones entre las bacterias y las superficies de la mucosa juegan un papel importante entre los embriones y las fases iniciales de vida de los peces marinos, ya que la superficie mucosa de los

embriones y larvas representa un buen sustrato para la adhesión y colonización de las bacterias (Hansen y Olafsen, 1989).

La adhesión bacterial y la colonización de la superficie del huevo (fases segmentación del huevo y embrión; Balon, 2002) ocurre horas después de la fertilización. Durante la incubación de los huevos y como consecuencia de las altas densidades presentes en los incubadores, se dan condiciones distintas a las presentes en el medio silvestre, que favorece la proliferación de bacterias oportunistas sobre la microflora nativa, que se van a adherir en la superficie del huevo y conformaran la epiflora. La epiflora bacteriana puede crear condiciones letales o subletales para los embriones por consumo excesivo de oxígeno o por producción toxica de metabolitos (Barker *et al.*, 1989; Hansen y Olafsen, 1989). Enzimas proteolíticas producidas por miembros de la epiflora adherente puede causar serios daños al desarrollo del embrión y subsecuentemente pueden afectar la eclosión y la sobrevivencia de los embriones libres, así como también pueden evitar una posterior adhesión de otras bacterias (Olafsen, 2001).

Existe poca información sobre la microflora adherente de los huevos de peces, tanto en su ambiente natural, como en las incubadoras de las instalaciones de cultivo intensivo. En el caso de *Gadus morhua* e *Hippoglossus hippoglossus*, la microflora nativa que coloniza el corión de los huevos, fue dominada por miembros de los géneros *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Aeromonas* y *Flavobacterium* (Hansen y Olafsen, 1989).

En el caso del establecimiento de la microflora del tracto gastrointestinal de las larvas, es un proceso gradual que se inicia cuando ingieren agua, tiempo que será variable en función del momento en el que se de la apertura de la boca, de acuerdo al tipo de ontogenia que presenten (Balon, 1984; Balon 2002). En el caso de los peces con ontogenia de transición

(p. ejem. Salmonidae), la ingesta de bacterias se da en la fase de embrión libre, mientras que en el caso de los peces con ontogenia indirecta (p. ejem. Serranidae) el evento se da en la fase de apterolarva. La primera exposición a altas densidades bacterianas es probablemente importante para la tolerancia inmune y para el establecimiento de la microflora intestinal protectora (Hansen y Olafsen, 1999).

El uso rutinario de antibióticos durante la crianza de larvas de peces no es recomendable, dado que esto puede incrementar el riesgo de promover resistencia a los antibióticos y afectar de manera adversa la microflora nativa de los embriones y larvas.

### 2.3 SISTEMA INMUNE EN PECES

El sistema inmune tiene como función principal el de actuar como una respuesta de defensa contra las infecciones. En los peces, se ha comprobado que esta respuesta inmunológica está bien desarrollada e integrada y en el caso de los teleósteos, existen algunas diferencias importantes respecto a los vertebrados superiores como son la ausencia de médula ósea y de nódulos linfáticos. Además los principales tejidos linfomieloides en los teleósteos, se encuentran en el timo, riñón y bazo, aunque también el hígado, piel e intestino se han considerado que forman parte del sistema de defensa (Fänge, 1992; Ellis, 1988; Fergusson 1989).

De igual manera que los vertebrados superiores, el sistema inmune de los peces se divide en dos tipos: el sistema inmune innato o inespecífico y el sistema inmune adquirido o específico. El primero, está formado por componentes humorales y celulares que actúan eliminando o bloqueando un agente extraño o antígeno, de forma inespecífica, mientras que el sistema inmune adquirido se caracteriza por la producción de anticuerpos que actúan

específicamente contra un antígeno, participando también elementos celulares como los linfocitos T (Bernstein *et al.*, 1998).

Esta división entre los distintos tipos de respuesta inmune, se debe considerar como una clasificación artificial, ya que cuando un agente patógeno ataca al organismo, este se defiende mediante la interacción de la mayoría de los elementos que conforman su sistema inmunológico.

Los mecanismos de defensa no específicos juegan un papel importante durante los procesos infecciosos. Cuando se presenta un proceso de este tipo, la primera línea de defensa que actúa es de tipo física y la conforman el epitelio intacto y su secreción, el mucus, que forman una barrera primaria entre el pez y su medio ambiente. El mucus y la piel contienen moléculas inmunoreactivas que forman parte de los componentes humorales de la respuesta inespecífica, como son: lisozima, Sistema del Complemento, anticuerpos naturales (Ab) e inmunoglobulinas (Ig).

Así también, el mucus que tapiza las paredes del tracto alimentario junto con enzimas proteolíticas y el pH extremo, sirven de defensa contra patógenos potenciales (Stoskopf, 1993). Otros de los componentes humorales que pueden participar en el sistema inespecífico de defensa son: lectinas, enzimas líticas, transferrinas/lactoferrinas, ceruloplasminas, proteína C reactiva y el interferón.

Con respecto a los componentes celulares que actúan en la inmunidad inespecífica de los peces se encuentran los neutrófilos y los monocitos-macrófagos, que colaboran como células fagocíticas, y las células NK o citotóxicas.

Los neutrófilos, se les conoce también como polimorfonucleares o leucocitos específicos. Su citoplasma contiene numerosos gránulos y se consideran pobremente fagocíticos, ya que

ingieren poco material extraño. Sin embargo, poseen la mayoría de las enzimas presentes en los mamíferos y por lo tanto su principal papel es la lisis extracelular por secreción de estas enzimas y otras sustancias antimicrobianas. Pueden producir severos daños tisulares por liberación de los radicales libres del oxígeno (Tyzard, 1992). Otra de sus funciones es su participación en la respuesta inflamatoria aguda. A partir de los pronefros, los neutrófilos pasan al torrente circulatorio y migran a los lugares de inflamación, en respuesta a estímulos quimiotácticos, aunque este fenómeno se produce de forma más lenta que en mamíferos. (Campbell y Murru, 1990; Bly *et al.*, 1990; Hine, 1992).

Los monocitos son móviles, fagocíticos y normalmente de mayor tamaño que otros leucocitos. Tienen un citoplasma vacuolado y basofílico. Se han encontrado en sangre y riñón y su presencia ha sido demostrada sólo en algunas especies. Los macrófagos son células con gran actividad fagocítica derivados de los monocitos que se encuentran en tejidos y en las cavidades peritoneal y pericárdica, de mayor tamaño que los anteriores, y por esta razón pueden fagocitar partículas más grandes. En teleósteos los macrófagos son especialmente abundantes en el bazo y en el tejido linfomieloide renal. Existen otras estructuras que se denominan como melanomacrófagos por su semejanza con los macrófagos (Roberts, 1975), se caracterizan por su alto contenido de melanina y su tendencia a agregarse, entre sus funciones se encuentra la de procesar y acumular los productos de deshecho celulares, provenientes principalmente de la destrucción de eritrocitos y del metabolismo del hierro, así como de tejidos dañados en procesos patológicos, como consecuencia de ellos se acumulan pigmentos tales como melanina, lipofuscina y hemosiderina (Agius, 1985).

## 2.4 TAXONOMÍA DEL GÉNERO *Aeromonas*

Inicialmente, Sniesko (1957) basado en caracteres fenotípicos, propuso cuatro especies para el género *Aeromonas*, repartidas en dos grandes categorías, el grupo de las móviles (*A. liquefaciens*, *A. punctata* y *A. hydrophila*) y el grupo de las no-móviles (*A. salmonicida*), las cuales fueron ubicadas en la familia Pseudomonadaceae. Posteriormente el género *Aeromonas* fue ubicado en la familia Vibrionaceae (Shubert, 1974), pero debido a diferencias en las secuencias de los genes 16S rRNA, 5S rRNA y de los resultados de hibridación del DNA-DNA, fue que Colwell *et al.* (1986) lo colocaron en su propia familia, la Aeromonadaceae.

La taxonomía del género *Aeromonas*, ha estado sujeta a muchos cambios, debido a que inicialmente se utilizaron caracteres fenotípicos, que contribuyeron a la confusión al tratar de identificar las distintas cepas aisladas del ambiente, de los diversos animales acuáticos, así como de muestras clínicas, ha sido tal el nivel de confusión de algunos autores, que se recomendó que al grupo de las *Aeromonas* móviles se les considerara como complejo *A. hydrophila* (Janda, 1991).

Una de las primeras clasificaciones de este género, en las que se utilizaron los grupos de hibridación (GH) del DNA, con el fin de conjuntar las genoespecies con los dos grupos previamente establecidos, fue propuesta por Popoff *et al.* (1981). El primer grupo estaba formado por especies mesófilas y móviles que crecen óptimamente a 28 °C y genéticamente el grupo se considero amplio y heterogéneo, este grupo estaba compuesto por tres fenoespecies, *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. sobria*. El segundo se designo como el grupo psicrófilo, cuya temperatura óptima de crecimiento se definió entre los 22-25 °C, era un grupo genéticamente más reducido y homogéneo y estaba constituido por una sola

especie: *Aeromonas salmonicida*, de la cual se reconocieron tres subespecies: *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, *A. salmonicida* subsp. *masoucida* y *A. salmonicida* subsp. *achromogenes*.

Posteriormente, se dio el reconocimiento del género *Aeromonas* en el Manual de Bergey (Poppof, 1984), desde entonces a la fecha el número de especies ha variado de 4 hasta 15. Debido a que el género posee una taxonomía muy compleja por la gran heterogeneidad genética constitutiva que presenta y que consta de especies difíciles de identificar con caracteres fenotípicos, fue que se desarrollaron los métodos moleculares para la identificación de las cepas de *Aeromonas* (Altwegg et al., 1991; Martinetti-Lucchini y Altwegg, 1992), los cuales representaron un avance pero tuvieron discrepancias considerables, con respecto a los métodos que utilizaron la hibridación del DNA y la secuencia del gen 16S rRNA (Shubert y Hegazi, 1988; Esteve *et al.*, 1995; Huys *et al.*, 1996; Martínez-Murcia, 1999). Por ese motivo, se propuso un método más prometedor, basado en el polimorfismo de fragmentos de restricción obtenidos de un producto de la reacción en cadena de la polimerasa (RFLP-PCR) del gen 16S rDNA (Borrell *et al.* 1997; Figueras *et al.* 2000b), no obstante este método también ha sido cuestionado por generar algunos resultados confusos (Graf, 1999; Figueras *et al.*, 2000a).

Actualmente, se pueden reconocer 17 grupos de hibridación (GH) del DNA o geno-especies, de los cuales 15 son fenoespecies y 2 no nombradas: *A. hydrophila* GH1; *A. bestiarum* GH2; *A. salmonicida* GH3; *A. caviae* GH4; *A. media* GH5; *A. eucrenophila* GH6; *A. sobria* GH7; *A. veronii* bt. *sobria* GH8; *A. jandaei* GH9; *A. veronii* bt. *veronii* GH10; *Aeromonas* sp. GH11; *A. schubertii* GH12; *Aeromonas* sp. GH13; *A. trota* GH14; *A. allosaccharophila* GH15; *A. encheleia* GH16 y *A. popoffii* GH17 (Allen *et al.*, 1983;



Hickman-Brenner *et al.*, 1987, 1988; Schubert y Hegazi, 1988; Carnahan *et al.*, 1991a,b; Martínez-Murcia *et al.*, 1992; Esteve *et al.*, 1995; Ali *et al.*, 1996; Huys *et al.*, 1997).

Recientemente han sido descritas dos nuevas especies, *Aeromonas simiae* Harf-Monteil *et al.*, 2004 y *A. molluscorum* Miñana-Galbis *et al.*, 2004. Otras especies propuestas como *A. ichtiosmia*, *A. enteropelogenes* y *A. culicicola* (Shubert *et al.*, 1990a, b; Pidiyar *et al.*, 2002), han sido consideradas como sinónimos de *A. veronii*, *A. trota* y *A. veronii* respectivamente (Collins *et al.*, 1993; Huys *et al.*, 2005; Saavedra *et al.*, 2007).

Existen tres subespecies de *Aeromonas hydrophila*: *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* (Chester, 1901) Stainer, 1943 (App. 1980); *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* (Huys *et al.*, 2002); *A. hydrophila* subsp. *ranae* (Huys *et al.* 2003).

En el caso de *Aeromonas salmonicida*, se reconocen cinco subespecies: *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* (Lehman y Neuman, 1896) Griffin *et al.*, 1953; *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* (Smith, 1963); *Aeromonas salmonicida* subsp. *masoucida* Kimura, 1969; *Aeromonas salmonicida* subsp. *smithia* Austin *et al.*, 1989; *Aeromonas salmonicida* subsp. *pectynolitica* Pavan *et al.*, 2000.

El elevado número de genospecies, ha provocado que en la mayoría de los laboratorios, no discriminen entre las especies que pertenecen a *Aeromonas hydrophila* (GH1), *A. bestiarum* (GH2) y el grupo mesófilo de *A. salmonicida* (GH3), por lo que se manejan como el complejo fenotípico de *Aeromonas hydrophila* (Kuijper *et al.*, 1989; Ali *et al.*, 1996), lo que da como consecuencia una mayor confusión dentro de la taxonomía de este género. Una de las recomendaciones para la identificación de cepas de *Aeromonas* spp., es considerar un conjunto de métodos, esto con el fin de evitar confusiones como la cometida por Saha y Chakrabarti (2006), quienes propusieron la especie *Aeromonas sharmiana*, con

base a la caracterización bioquímica, susceptibilidad a los antibióticos, perfiles de ácidos grasos celulares y la secuenciación del gen 16S rRNA, pero no realizaron el estudio de hibridación del DNA-DNA de esta nueva especie, hasta que Martínez-Murcia *et al.* (2007) lo hicieron y encontraron que la especie descrita ni siquiera era miembro del género *Aeromonas*. Otra forma de garantizar la identificación de las cepas de *Aeromonas* con la que se trabaja, es que esta provenga de un cepario y que haya sido plenamente identificada. Las especies con mayor importancia clínica por estar asociadas con la presencia de diarrea y enfermedades intestinales son *Aeromonas hydrophila*, *A. veronii* bv. *sobria*, *A. caviae*, *A. jandaei*, *A. veronii* biovar *veronii*, *A. schubertii* y *A. trota* (Janda y Abbottt, 1998). En el caso de *A. hydrophila*, es una especie de interés económico y clínico, debido al resto de enfermedades que ocasiona en peces y humanos como patógeno primario u oportunista (Austin *et al.*, 1998; Elwitigala *et al.*, 2005).

## 2.5 *Aeromonas hydrophila*

### 2.5.1 OCURRENCIA

Tiene una amplia distribución en ambientes acuáticos (Kersters *et al.*, 1995; Holmes *et al.*, 1996; Fiorentini *et al.*, 1998; Gavriel *et al.*, 1998; Dumontet *et al.*, 2000; Fernández *et al.*, 2000), es un habitante normal del tracto intestinal de peces silvestres de agua dulce aparentemente sanos, de las especies *Ctenopharyngodon idella*, *Carassius auratus*, *Salmo gairdneri* (= *Oncorhynchus mykiss*), *Scardinius erythrophthalmus hesperidicus*, *Leuciscus cephalus albus*, *Tinca tinca* y *Esox lucius* (Trust *et al.*, 1974; Popovic *et al.*, 2000). Además, puede ser encontrada naturalmente en ambientes estuarinos (Hazen *et al.*, 1978), por lo que también ha sido aislada del tracto intestinal de algunos peces estuarinos:

*Plotosus anguillaris*, *Labeo rohita*, *Epinephelus megachir*, *Lates calcarifer*, *Oreochromis niloticus* (Rahim *et al.* 1985).

### 2.5.2 CARACTERÍSTICAS

*Aeromonas hydrophila*, es un cocobacilo Gram negativo móvil, quimio-organotrófico con metabolismo oxidativo y fermentativo, citocromo oxidasa y catalasa positivo, reduce los nitratos a nitritos sin producción de gas y es resistente a el agente vibriostático O/129. Su crecimiento óptimo ocurre después de 24 h a 28 °C en medio AST. Da positiva las pruebas de Arginina dihidrolasa-, lisina descarboxilasa-, indol-, hidrólisis de la esculina y Voges-Proskauer. No produce ureasa, desaminasa triptofano, ornitina descarboxilasa ni H<sub>2</sub>S, así también, fermenta la glucosa con producción de ácido y gas. Esta bacteria., utiliza Los siguientes sustratos como única fuente de carbón y energía: N-acetil β-D-galactosamina, L-alanina, L-arabinosa, ρ-arbutin, DL-lactato, D-manitol, putrescina, D-serina, salicina y D-sacarosa. Por otra parte, no usa D-celobiosa, DL-isocitrato, β-alanina, 4-aminobutirato o ácido urocánico. Además, produce ácido de L-arabinosa, D-manitol, salicina y D-sacarosa, pero no de D-celobiosa, lactosa, D-ramnosa o D-sorbitol. Otras características son, que tiene una fuerte actividad β-hemolítica sobre AST complementado con 5% de sangre de carnero (Huys *et al.*, 2002) y que puede crecer entre temperaturas de 4 y 42 °C, dentro de un intervalo de pH de 4.5 hasta 9 y una concentración de sal de 0 a 40 ‰ (Colwell *et al.* 1986).

### 2.5.3 PATOLOGÍA EN PECES

La enfermedad por *Aeromonas hydrophila*, en los sistemas de cultivo, puede tomar proporciones epizoóticas cuando los peces están inmunocomprimidos por el estrés provocado por el hacinamiento, baja concentración de oxígeno, acumulación de productos de desecho en el agua o bien por presentar alguna otra enfermedad (Peters, 1988).

Esta bacteria, puede ser un patógeno oportunista en sistemas de producción de peces de agua dulce, tales como *Micropterus salmoides*, *Anguilla rostrata*, *A. anguilla*, *Ictalurus punctatus*, *Carassius carassius*, *C. auratus*, *Megalobrama amblycephala*, *Hypophthalmichthys molitrix*, *Mylopharyngodon piceus*, *Ictiobus cyprinellus*, *Monopterus albus*, *Oncorhynchus mykiss* (Huizinga *et al.*, 1979; Davis y Hayasaka, 1983; Jack *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1993; Qian *et al.*, 1997; Nielsen *et al.*, 2001; Kozinska, 2007). Por otra parte, *Aeromonas hydrophila* también se ha encontrado causando enfermedad en peces marinos como *Salmo salar*, *Puntazzo puntazzo* y *Dicentrarchus labrax* (Cox *et al.*, 1986; Doukas *et al.*, 1998; Athanassopoulou *et al.*, 1999).

La infección causada por *Aeromonas hydrophila* puede ser crónica (leve y de largo plazo) y afectar solo a un pequeño número de peces o puede ser aguda (intensa y de corto plazo), que se caracteriza por presentar una elevada mortalidad (Camus *et al.*, 1998).

Los peces afectados pueden tener diversos signos clínicos externos, desde una súbita muerte en peces aparentemente sanos, hasta una falta de apetito, anormalidades de nado, branquias pálidas, apariencia inflada y ulceraciones en la piel. En peces se describen tres tipos de la enfermedad provocada por *Aeromonas hydrophila*: 1) la septicémica; 2) la cutánea y 3) una forma latente, que es una forma sistémica sin presentación de signos

clínicos, la cual es la mas peligrosa, ya que los peces actúan como portadores de la enfermedad (Grizzle y Kiryu, 1993).

1) La septicémica es mas común en peces de agua dulce producidos en estanques (Piper *et al.*, 1982; Austin y Austin, 1987; Post, 1987; Frerichs y Roberts, 1989; Thune *et al.*, 1993; Esteve *et al.*, 1995a,b; Austin y Adams, 1996; Kozinska, 2007), aunque también puede estar presente en peces del medio silvestre y llega a afectar a peces marinos. Se caracteriza por que los peces presentan una coloración oscura, congestión hemorrágica, necrosis de órganos internos y finalmente la muerte. Los órganos comúnmente afectados por esta bacteria, incluyen branquias, riñones, hígado, bazo, páncreas y sistema músculo esquelético.

2) La cutánea, es una infección localizada, con lesiones limitadas a piel y músculo. Las úlceras en la piel pueden ocurrir en cualquier sitio sobre el pez y comúnmente están rodeadas por un borde brillante de color rojizo, se presenta en algunos peces sin escamas como los bagres *Ictalurus punctatus*, *Clarias batrachus*, *C. gariepinus* (Angka, 1990; Grizzle y Kiryu, 1993) y en otro tipo de peces como *Carassius carassius* y *Catla catla* (Karunasagar *et al.*, 1978; Llobrera y Gacutan, 1987). Una variante de esta enfermedad, se manifiesta en *Micropterus salmoides* y consiste en petequias hemorrágicas sobre el cuerpo, hemorragias en la base de las aletas desmembradas y exoftalmia uni o bilateral, así como ulceraciones extensivas crónicas, focos hemorrágicos, edema y necrosis dérmica, la cual expone músculos que producen infiltración de mononucleares y células granulocitas inflamatorias. Internamente, el hígado y el riñón son blancos para los productos tóxicos bacterianos, en donde los casos más severos, provocan una destrucción completa de la

integridad estructural de ambos órganos, no hay cambios histopatológicos serios ni en el bazo ni en el corazón (Hazen *et al.*, 1978a; Huizinga *et al.*, 1979).

En ambos tipos, los signos clínicos internos varían en función de un determinado número de factores, como son la virulencia del organismo, la resistencia del pez a la infección, la presencia o ausencia de bacteremia o septicemia y a las condiciones del estrés. Debido a la variabilidad de estos signos, la diagnosis de la enfermedad basada en el cuadro clínico es altamente irrealizable y puede ser económicamente desastroso para los productores de peces (Swan y White, 1991).

#### 2.5.4 PATOLOGÍA EN HUMANOS

En el humano se reportan infecciones con *A. hydrophila* como patógeno primario en casos de diarrea aguda en personas inmunocompetentes de todos los grupos de edad (Pitarangsi *et al.*, 1982; Aggar *et al.*, 1985; Cumberbatch *et al.*, 1993; Chopra y Houston, 1999). En algunas ocasiones, la septicemia que provoca puede tener consecuencias fatales, sobre todo en pacientes debilitados por enfermedades, como la leucemia (Dean y Post, 1967; Davis *et al.*, 1978). También ha sido aislada de pacientes con gastroenteritis, artritis séptica, peritonitis, meningitis, osteomielitis, infecciones del tracto urinario, infecciones en heridas asociadas al agua y severas degeneraciones musculares (Semel y Trenholme, 1990; Krovacek *et al.*, 1994; Janda *et al.*, 1995; Chopra y Houston, 1999; Elwitigala *et al.*, 2005). En general las cepas aisladas del ambiente son menos patógenas que las de los peces.

### 2.5.5 FACTORES DE VIRULENCIA EN PECES Y HUMANOS

Uno de los principales problemas para estudiar los factores de virulencia relacionados con la patogenicidad en humanos, es la falta de un órgano apropiado o modelo animal que reproduzca los síntomas de las enfermedades intestinales como la gastroenteritis. A pesar de ello, el principal avance se ha dado en identificar un número de estructuras clave, enzimáticas y caracteres asociados a la célula que parecen jugar un papel importante en los procesos de infección intestinales y extraintestinales en animales y humanos (Janda, 1991). *Aeromonas hydrophila* puede producir diversos factores de virulencia asociados con gastroenteritis e infecciones de heridas en muchos animales y humanos (Rose *et al.*, 1989). No obstante, aun no existe evidencia concluyente para explicar este tipo de desordenes, ya que no se ha encontrado una relación directa entre la citotoxicidad para peces y la patogenicidad a líneas celulares de homeotermos (Johnson *et al.*, 1985; Santos *et al.*, 1988), su relación mas bien se da por la semejanza de moléculas similares que juegan un papel importante en la patogenicidad de otras especies bacterianas, tales como *Escherichia coli* (Janda, 1991).

La bacteria *Aeromonas hydrophila* se ha relacionado con un número de posibles factores de virulencia, incluyendo una gama de exotoxinas, como las aerolisinas y hemolisinas (Chakraborty *et al.*, 1987; Howard *et al.*, 1987; Hirono *et al.*, 1991), enzimas extracelulares, las cuales digieren componentes celulares, tales como proteasas, amilasas y lipasas (Chang *et al.*, 1997; Cascón *et al.*, 1996; Pemberton *et al.*, 1997; Cascón *et al.*, 2000). Existen otros factores virulentos implicados en la resistencia de *Aeromonas hydrophila* a la defensa inmune no específica del hospedero, tales como la proteína de la capa S (Murray *et al.*, 1988; Thomas y Trust, 1995; Chen *et al.*, 1998), la habilidad para

internarse en células (Tan *et al.*, 1998), resistencia al suero (Mittal *et al.*, 1980; Janda *et al.*, 1984), resistencia a la muerte mediada por fagocitosis (Leung *et al.*, 1995). Además también están relacionados con la inducción de la apoptosis en células inmunes de peces (Shao *et al.*, 2004).

## 2.6 INFECCIONES EXPERIMENTALES EN LAS FASES INICIALES DE VIDA DE LOS PECES

### a) Periodo embrionario

El efecto que causan otras bacterias de manera experimental en las fases de segmentación del huevo y embrión (huevo) es variable, por ejemplo *Flexibacter ovolyticus* provocó una alta mortalidad en *Hippoglossus hippoglossus* y *Gadus morhua*, ya que sus factores virulentos permitieron la penetración del corión por la disolución tanto del corión como de la zona radiata por una actividad exoproteolítica. En cambio *Vibrio anguillarum* y *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* no causan una mortalidad significativa a *Hippoglossus hippoglossus*, sino que se mantienen adheridos al corión e infectan los embriones libres recién eclosionados provocándoles mortalidades significativas (Bergh, 1999). Esta alta mortalidad también ocurrió en embriones de *Amphiprion clarkii*, al realizar infecciones experimentales con una cepa aislada de huevos enfermos de dos especies de Pomacéntridos, esta cepa posteriormente fue identificada como *Pseudoalteromonas piscida*, mientras que también se probaron otras dos cepas de referencia *Vibrio parahaemolyticus* y *Listonella anguillarum*, las cuales no tuvieron ningún efecto sobre la mortalidad (Nelson y Ghiorse, 1999).



En otros ensayos experimentales, como en *Sparus aurata* (Makridis *et al.*, 2005), tampoco se observó un efecto en el porcentaje de eclosión, provocado por seis cepas bacterianas aisladas de sus sistemas de producción de alimento vivo (*Cytophaga* sp., *Roseobacter* sp., *Ruergeria* sp, *Paracoccus* sp, *Aeromonas* sp. y *Shewanella* sp.) ni tampoco con *Sardina pilchardus* (Míguez *et al.* 2004) al infectar los embriones con la epiflora nativa de los sitios de desove (*Vibrio*, *Aleteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas* y *Morantxella*). Los resultados anteriores, nos indican que para que actúen los productos extracelulares tóxicos bacterianos, depende de la patogenicidad de la bacteria y además que la adhesión a la superficie del corión, se da en un periodo embrionario con el tiempo suficiente para que alcancen a actuar los productos extracelulares sobre la superficie del corión.

Otra fuente de aislamiento de cepas bacterianas adheridas a los huevos de peces desovadores pelágicos, han sido las instalaciones de cultivo, como en el caso de *Polydactylus sexfilis* y *Seriola rivoliana*, a partir de los cuales se aislaron 118 cepas y se identificaron 3 géneros presuntivos para *P. sexfilis* (*Cytophaga*, *Pseudoalteromonas* y *Vibrio*) y 7 para *S. rivoliana* (*Bacillus*, *Alteromonas*, *Colwellia*, *Vibrio*, *Erythrobacter*, *Flavobacterium* y *Cytophaga*), con un total de 22 grupos distintos para las dos especies, de estos se probó la patogenicidad de ocho cepas y ninguna tuvo un efecto sobre la tasa de eclosión de los huevos de *P. sexfilis*, ni en la fase de apterolarva, excepto la cepa *Vibrio* ME2-03, la cual provocó una mortalidad total a las 48 horas de infectados los embriones (Verner-Jeffreys *et al.*, 2006).

## **Periodo juvenil**

Por otro lado, el estudio de las infecciones bacterianas causadas por cepas de *Aeromonas hydrophila* en juveniles de peces ha sido bien documentado.

A partir de cepas de *Aeromonas hydrophila* aisladas de peces enfermos y asintomaticos de *Anguilla anguilla*, detectados durante una epizootia en una granja. La patogenicidad de las cepas fueron probadas sobre juveniles de anguila, mediante inyección intraperitoneal (concentraciones de  $10^4$ - $10^9$  UFC/ml) y a las 18 horas postinfección se presento una septicemia aguda, de acuerdo a la mortalidad observada y una LD<sub>50</sub> de  $10^{5.4}$  a  $10^{7.5}$  UFC/pez (Esteve *et al.* 1993). En otro estudio, realizado por Yavuzcan *et al.* (2005) para la misma especie, se analizaron los cambios en los parámetros hematológicos para evaluar los efectos de la enfermedad provocada por *Aeromonas hydrophila* y encontraron que existen diferencias significativas entre los peces sanos y los enfermos en el hematocrito, la proteína plasmática total, la glucosa en el plasma y en tres iones del plasma ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ), por lo que se consideran los parámetros hematológicos como buenos indicadores de la enfermedad.

Otra especie estudiada ha sido *Oncorhynchus mykiss*, a partir de una epizootia presentada en una granja de truchas, se aislaron cepas, cuya patogenicidad fue probada mediante inyecciones intramuscular e intraperitoneal, con el fin de caracterizar la infección se utilizaron parámetros microbiológicos, hematológicos y bioquímicos. A las 62 horas después de las inyecciones, se presento una infección aguda, con lesiones en la piel y hemorragias en el hígado, que también provoco una anemia severa caracterizada por una cuenta reducida de eritrocitos y bajos niveles del hematocrito y la hemoglobina. Además en

el plasma sanguíneo se registraron niveles reducidos de proteína total, colesterol, triacilglicerol y calcio total, así como un incremento en el nivel de urea (Rehulca, 2002).

Otro estudio realizado con esta misma especie, fue el de Saavedra *et al.* (2004), en el cual aislaron cepas de *Aeromonas hydrophila* a partir de muestras de agua, piel de truchas, riñón e hígado. Al probar las cepas experimentalmente en un lote de truchas, la mayoría desarrollaron lesiones con hemorragias y necrosis en la piel y base de las aletas e incluso algunos tenían el abdomen distendido con fluido serosanguíneo y petequias hepáticas. En el estudio histopatológico se observó que la piel tenía cortes musculares con dermatitis aguda crónica y miositis con un rico infiltrado de neutrofilos; en el hígado se observó hepatitis multifocal no purulenta y colangiohepatitis; las lesiones en el riñón estuvieron caracterizadas por pequeños focos de necrosis y por la presencia de melanina libre, que es producto de la ruptura de los melanomácrofagos; en las branquias se observó una bronquitis crónica con un infiltrado abundante de eosinofilos. El resto de los órganos no mostraron lesiones considerables.

Los estudios realizados con juveniles experimentalmente infectados con *Aeromonas hydrophila* de *Clarias batrachus*, registraron cambios histopatológicos, los cuales incluyeron necrosis y hemorragias en el riñón, hígado, páncreas e intestino, estos cambios estuvieron probablemente asociados con la citotoxina producida por la bacteria (Angka, 1990). En otro estudio con juveniles de *C. batrachus*, experimentalmente infectados a concentraciones de 0 a  $10^8$  UFC/ml y distintas vías de inoculación con cepas de *Aeromonas hydrophila* aisladas de *Ophicephalus (=Channa) striatus* con la enfermedad del síndrome ulcerativo epizootico (EUS, por sus siglas en inglés), se encontró que solo concentraciones

de  $10^6$  UFC/ml o mayores del inóculo por la vía intramuscular indujeron lesiones dermomusculares y se ha registrado que al analizar su patogenicidad en conjunto con otras tres bacterias que fueron aisladas de la misma fuente, que es la única bacteria que induce severas lesiones dermomusculares (Lio-Po *et al.*, 1996, 1998).

Otro trabajo se hizo a partir de cepas de *Aeromonas hydrophila* caracterizadas como virulentas y aisladas de riñones de *Clarias gariepinus*, con las cuales se inocularon juveniles de la misma especie vía intramuscular a concentraciones de  $1 \times 10^4$  hasta  $1 \times 10^8$  UFC/ml y les causaron severas lesiones de piel y músculo, así como tejido ulcerativo en hígado y riñón, donde se mantuvieron las bacterias no mas de cinco días después de la inyección, aparentemente debido al inicio del desarrollo de la inmunidad efectiva . Además los peces empezaron a morir 18 horas después de la inyección con cepas virulentas (Angka *et al.*, 1995).

La infección con un complejo de *Aeromonas hydrophila* a *Ictalurus punctatus*, provocaron en los peces tres grupos de infecciones, la infección sistémica, la cutánea y la latente (infección sistémica sin signos externos). La necrosis hepática estuvo asociada a todos los grupos, pero fue más constante en la infección sistémica, que también tuvo una tendencia a provocar atrofia pancreática y necrosis. No hubo leucocitos infiltrados en áreas necróticas del hígado y del páncreas exocrino intrahepático (Grizzle y Kiryu, 1993). En otro estudio con la misma especie, se encontró que los cambios que se observaron en la cabeza del riñón, en el incremento en agregado de macrófagos, lipofuscina y hemosiderina fueron útiles para la cuantificación del daño causado por la infección sistémica provocada por *Aeromonas hydrophila* (Matsche y Grizzle, 1999).

En juveniles de *Rhamdia quelen* se probaron dos concentraciones de *Aeromonas hydrophila* inoculadas vía intramuscular ( $7.5 \times 10^6$  y  $3.6 \times 10^7$  UFC/ml), que provocaron mortalidades del 100 y 25 % respectivamente, además de pérdida de balance, apatía, exoftalmia y alteraciones histológicas como necrosis, hemorragias e infiltrados inflamatorios que alcanzaron la capa de la epidermis tan bien como la dermis y la musculatura (Boijink y Brandao, 2001).

Yesmin (2004) llevo a cabo una infección intraperitoneal de *Channa punctatus* y observo una septicemia aguda a las concentraciones de  $3.42 \times 10^8$  y  $3.42 \times 10^9$ , además la bacteria fue recuperada del riñón.

En el estudio realizado por Huizinga *et al.* (1979) con *Micropterus salmoides*, fueron infectados peces con *Aeromonas hydrophila* y las lesiones que provoco fueron ulceraciones crónicas extensivas, hubo hemorragia focal, edema y necrosis dérmica, la cual expuso los musculos produciendo la infiltración de mononucleares y células granulocíticas inflamatorias. Internamente, el hígado y los riñones fueron focos para productos tóxicos de *A. hydrophila*, en los casos mas severos, se observó una destrucción completa de la integridad estructural de ambos órganos. No hubo cambios histopatológicos graves en el bazo o el corazón, aun en los casos con daño masivo en el hígado y en los riñones.

La infección experimental vía inyección intramuscular de juveniles de *Mugil cephalus* con *Aeromonas hydrophila* causó una septicemia aguda. La enfermedad se caracterizó por un proceso inflamatorio inicial y cambios proliferativos y posteriormente necróticos. Enteritis y necrosis hepática fueron comunes en peces enfermos (Soliman *et al.*, 1989).

## 2.7 ESTUDIOS BACTERIOLÓGICOS CON PECES MARINOS EN MÉXICO

Dentro de los estudios bacteriológicos realizados con peces marinos que tengan un potencial acuacultural en México, destacan los realizados con *Paralabrax maculatofasciatus*.

En un lote de reproductores mantenido en cautiverio, se evaluó la incidencia de *Vibrio* en lesiones dérmicas e internas. En las lesiones externas se identificaron presuntivamente *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *Vibrio* sp., mientras que en las lesiones dérmicas únicamente se identificó presuntivamente a *V. alginolyticus* Vpb-C7. Además, durante infecciones experimentalmente inducidas, esta misma cepa a una concentración de  $10^8$  células, fue la que provocó signos clínicos y mortalidad (Martínez-Díaz y Anguas-Vélez, 2002).

A partir de la microflora bacteriana presente en los sistemas de cultivo y los alimentos de apoyo, durante la crianza larvaria fueron aisladas 416 cepas bacterianas, que al ser identificadas con el sistema multipuebas Biolog<sup>®</sup> se encontraron 2 especies de *Aeromonas* y 8 de *Vibrio* (Moreno-Legorreta, 2004).

La patogenicidad de 10 cepas aisladas de los sistemas de cultivo (*Aeromonas* spp. y *Vibrio* spp.) y 2 cepas de referencia *Vibrio harveyi* y *V. alginolyticus*, se pudo evaluar durante el periodo embrionario y larval, mediante el establecimiento de un modelo experimental con la utilización del rotífero *Brachionus plicatilis* como vector. Al aplicar el modelo se encontró que las cepas *Vibrio harveyi*, *V. proteolyticus* 282 y *Vibrio* sp. 303, así como *Aeromonas media* 226 y 281, *A. ichthiosmia* 301 y *Aeromonas* sp. 302 fueron patógenas

para los embriones libres y las larvas y se sugiere que su vía de introducción de las cepas nativas al sistema pueda ser el rotífero (Macayo-Alvear, 2004).

A partir de peces adultos con septicemia hemorrágica, se logró el aislamiento de varias especies de *Vibrio* y *Staphylococcus saprophyticus*, y se probó la patogenicidad de *Vibrio ordalli*, *V. campbelli* y *Staphylococcus saprophyticus*, así como de una cepa de referencia de *Aeromonas veronii*. Con el fin de evaluar el daño causado, se utilizaron cortes histológicos y se tomaron parámetros fisiológicos-inmunológicos no específicos y parámetros hematológicos (Merino-Contreras, 1998). Además, se logró la inmunización de juveniles contra *Aeromonas veronii*, al utilizar la producción de anticuerpos a partir de una adhesina proveniente de la misma cepa bacteriana para preparar las vacunas (Merino-Contreras *et al.*, 2001).

Mediante el mantenimiento de cultivos celulares de células epiteliales de piel, branquias e intestino aisladas de peces adultos sanos, fue posible establecer un modelo para investigar las interacciones entre *Aeromonas veronii* y las células epiteliales de la mucosa del pez (Guzmán-Murillo *et al.*, 2000).

La construcción de vacunas de DNA, fue posible mediante el uso de genes que codifican para dos proteínas de membrana externa (Omp38 y Omp48) de la bacteria *Aeromonas veronii* y se probaron para proteger a peces de *Paralabrax maculatofasciatus* contra la infección experimental de dicha bacteria, encontrando que los peces quedaron inmunizados con una sola dosis (Vázquez-Juárez *et al.*, 2005).

Hasta la fecha, no se han realizado estudios bacteriológicos, donde se evaluó la patogenicidad de alguna cepa del género *Aeromonas* en los periodos iniciales de vida de *Mycteroperca rosacea*.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 BACTERIA

La bacteria utilizada en este trabajo fue *Aeromonas hydrophila* (Ah-315), proporcionada por el cepario del Laboratorio de Patogénesis Microbiana ubicado en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Campus La Paz y proveniente del stock del Department of Medical Microbiology, University of Lund. Debido a que la cepa se mantuvo a -80°C en un medio de Lauria-Bertani (LB) y glicerol al 15%, fue necesario reactivarla y comprobar su pureza por medio de identificación bioquímica y molecular, antes de ser utilizada en los bioensayos, para tal fin se siguieron los siguientes pasos:

- a) De la cepa Ah-315, se inocularon 100 µl en una caja de Petri con medio nutritivo de agar LB, se sembró por estría cruzada y posteriormente se incubó a 30 °C por espacio de 48 horas.
- b) A partir de este cultivo, se tomó una colonia para ser sembrada por estría cruzada en medio de agar LB y se incubó a 30 °C por espacio de 24 horas.
- c) De la cepa reactivada, se realizaron dos pruebas presuntivas de la familia Aeromonadaceae, la prueba de catalasa y la de citocromo oxidasa, así como un frotis teñido con la tinción de Gram para verificar la morfología bacteriana típica de esta familia.

La prueba de catalasa consistió en depositar sobre un portaobjetos una gota de peróxido de hidrógeno al 3 %. Enseguida, con un asa bacteriológica estéril, se tomó una pequeña muestra de la colonia bacteriana y se introdujo en una gota del peróxido de hidrógeno. La prueba se consideró positiva si hubo producción de burbujas de aire y negativa cuando no se produjeron.



Para realizar la prueba de oxidasa se tomo una pequeña muestra de la colonia bacteriana a probar con un asa bacteriológica estéril y se coloco sobre un trozo de papel Whatman No. 1, el cual fue impregnado previamente con unas gotas de tetrametil-p-fenilnediamina al 1%. Si después de 10 a 20 segundos se presento una coloración púrpura, la prueba se considero positiva y negativa cuando no hubo presencia de coloración o cuando tomo un color diferente al púrpura.

Para verificar la morfología bacteriana de la cepa reactivada, así como sus características tintoréales de acuerdo a la tinción de Gram, primero se realizo un frotis de una de las colonias desarrolladas, para lo cual, se tomo una pequeña muestra de la colonia con un asa bacteriológica estéril y se mezclo sobre una gota de solución salina estéril, previamente depositada sobre un portaobjetos y se dejo secar a temperatura ambiente. Posteriormente, se procedió a teñir el frotis con la técnica de tinción de Gram, la cual consistió en cubrir el frotis con una solución de cristal violeta durante un minuto. Enseguida se elimino el colorante con agua corriente y se agrego una solución de lugol por espacio de un minuto. Pasado este tiempo, se enjuago nuevamente con agua corriente y posteriormente se adicionaron unas gotas de alcohol acetona al 3 % hasta eliminar el colorante (aproximadamente de 15 a 20 segundos). Después se enjuago con agua corriente y por ultimo se agrego una solución de safranina durante un minuto, la cual se elimino con agua corriente. Por ultimo después de teñir la laminilla, se dejo secar y se observo bajo un microscopio óptico a un aumento de x1000.

d) Después de verificar que ambas pruebas fueron positivas y de observar en frotis cocobacilos Gram negativos, se realizo un nuevo asilamiento en Agar Sangre de Carnero con el objetivo de detectar actividad hemolítica y en Agar Maconkey, que es un medio

selectivo para bacilos Gram negativos. A partir de las colonias de bacterias desarrolladas en el medio selectivo de Agar Maconkey, las cuales fueron lactosa negativa, se llevo a cabo la identificación bioquímica.

Para la identificación bioquímica se utilizo un equipo automatizado (Marca Biomeriux, modelo Vitek, Francia), localizado en el laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital General de Zona No. 1 del IMSS en La Paz, Baja California Sur. Este equipo utiliza tarjetas que contienen treinta sustratos bioquímicos, que al metabolizarlos la bacteria modifican el tono de coloración del sustrato, lo cual es detectado por un lector automático de dicho aparato, de tal forma que el resultado que reporta el equipo Vitek, permite identificar la cepa bacteriana en % de pureza.

Los sustratos utilizados para la identificación bioquímica fueron los que se observan en la tabla I.

Tabla I. Sustratos bioquímicos contenidos en la tarjeta GNI del equipo automatizado Vitek. ACE, acetato; ADO, adonitol; ARA, arabinosa; ARG, arginina; COU, p-coumarico; CIT, citrato de Simmons; DP3, dp300; ESC, esculina; GC, control de crecimiento; GLU, glucosa; H2S, ácido sulfhídrico; INO, inositol; LAC, lactosa; LYS, lisina; MAN, manitol; MLT, maltosa; OFG, glucosa, lactosa, maltosa, manitol, xilosa; ONP, orto-nitrofenil-beta-D-galactopiranosida; ORN, ornitina; OXI, oxidasa; PLI, indoxil-beta-D-glucósido; PXB, polimixina; RAF, rafinosa; RHA, ramnosa; SOR, sorbitol; SUC, sacarosa; TDA, triptófano; URE, urea; XIL, xilosa.

<b>DP3</b>	<b>OFG</b>	<b>GC</b>	<b>ACE</b>	<b>ESC</b>	<b>PLI</b>
<b>URE</b>	<b>CIT</b>	<b>MAL</b>	<b>TDA</b>	<b>PXB</b>	<b>LAC</b>
<b>MLT</b>	<b>MAN</b>	<b>XIL</b>	<b>RAF</b>	<b>SOR</b>	<b>SUC</b>
<b>INO</b>	<b>ADO</b>	<b>COU</b>	<b>H2S</b>	<b>ONP</b>	<b>RHA</b>
<b>ARA</b>	<b>GLU</b>	<b>ARG</b>	<b>LYS</b>	<b>ORN</b>	<b>OXI</b>

f) La identificación molecular de la cepa se realizó por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, PCR por sus siglas en inglés. Para lo cual, a partir de un cultivo masivo de la cepa en medio de Agar LB, primero se hizo la extracción de ADN con el kit FastDNA, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Posteriormente al ADN extraído, se le realizó un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1 % para verificar la presencia de ADN, para lo cual, se corrieron 3 µl de la muestra y 2 µl de un marcador molecular de 500 pares de bases a 70 volts por espacio de una hora. Por último, se realizó la amplificación del ADN (PCR) en un termociclador. (Marca Gene Amp, modelo PCR System 2700, E.U.A.). El volumen total de cada reacción fue de 25 µl que consto de 1 µl de ADN como templado, 2.5 µl de buffer, 0.5 µl de desoxinucleotidotrifosfatos (dNTPs), 1.0 µl de cada cebador (Forward y Reverse), 0.3 µl de Taq ADN polimerasa y 18.7 µl de agua destilada. Se corrieron veinticinco ciclos bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94 °C por cinco minutos, alineamiento a 51 °C por un minuto, extensión a 72 °C por un minuto en cada ciclo. Como controles positivos se corrieron los templados de ADN de la cepa Ah-315 de *Aeromonas hydrophila* y el de la cepa A-186 de *Aeromonas veronii*, así como un control negativo compuesto de los componentes de la mezcla de reacción excepto el templado de ADN. Cabe mencionar, que se probaron dos juegos de cebadores de *Aeromonas veronii*, Forward: MR y Reverse: AV7, así como Forward: AV8 y Reverse: AV7, pues no se contó con cebadores específicos para *Aeromonas hydrophila* y se decidió probar ambos con el ADN extraído de la cepa Ah-315 de *Aeromonas hydrophila* por pertenecer al mismo género y esperando que cualquiera de los dos amplificara un fragmento del ADN de la cepa Ah-315.

Por último los productos de PCR fueron analizados por electrofóresis en un gel de agarosa al 1 %, con 5 µl de cada muestra y 2 µl de un marcador molecular de 500 pares de bases. El voltaje utilizado fue de 70 volts por espacio de 65 minutos.

#### 4.2 PREPARACIÓN DE LOS INÓCULOS DE *Aeromonas hydrophila*

A partir de la cepa reactivada de *Aeromonas hydrophila* Ah-315, aislada por estría cruzada, se tomo una colonia y se sembró por estría masiva en un medio nutritivo de agar soya tripticasa.

Después de 24 horas de incubación a 30 °C, se cosecho la bacteria en condiciones de esterilidad, en una campana de flujo laminar y se resuspendió en 10 ml de agua de mar estéril. Posteriormente con ayuda de una centrifuga refrigerada (Marca Beckman Coulter, modelo Allegra, USA) se realizaron dos lavados por centrifugación a 3,000 rpm/15' a 10 °C. Después se resuspendió en agua de mar estéril y se ajusto con ayuda de un colorimetro a una densidad óptica de 1 (Marca Internacional Científica, modelo Linson 3, México), que corresponde a una concentración de  $1 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias/ml (UFC/ml).

A partir de esta suspensión, se tomo un ml para preparar diluciones seriadas en 8 tubos Falcón estériles de 25 ml conteniendo un volumen de 9 ml de agua de mar estéril cada uno de ellos. Las concentraciones bacterianas que se prepararon fueron de  $1 \times 10^9$  a  $1 \times 10^1$  UFC/ml.

Posteriormente, se seleccionaron las siguientes concentraciones bacterianas para llevar a cabo el bioensayo con embriones y eleuteroembriones:  $1 \times 10^1$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^7$  UFC/ml. Estas suspensiones bacterianas fueron mantenidas en una incubadora refrigerada

(Marca Lab-Line Instruments, modelo AMBI-HI-LO CHAMBER, E.U.A) a 25 °C, hasta el momento de utilizarlas.

En el caso del bioensayo con juveniles, las concentraciones bacterianas se prepararon de la misma manera que con los embriones, aunque se utilizó solución salina estéril al 0.85 % (SSE) como diluyente. Las concentraciones bacterianas seleccionadas para este bioensayo fueron las siguientes:  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  UFC/ml. A partir de dichas suspensiones se tomaron 100  $\mu$ l de cada suspensión con jeringas de insulina y se mantuvieron a 4 °C antes de ser inoculadas en los peces.

#### 4.3 PECES DE ESTUDIO Y SISTEMAS DE EXPERIMENTACIÓN

##### 4.3.1 EMBRIONES DE *Mycteroperca rosacea*

Los embriones de cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea*, fueron proporcionados de un desove obtenido por inducción hormonal con hormona gonadotropina coriónica humana (GCH), a partir de reproductores de cabrilla sardinera mantenidos en el patio de cultivo de las instalaciones del CIBNOR, de acuerdo a los métodos descritos por Gracia-López *et al.* (2004). El porcentaje de fecundación de este desove fue del 98%.

El desove fue colocado en un vaso de precipitados con capacidad de dos litros, que contenía agua de mar estéril. Posteriormente, el desove fue trasladado al Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico del CIBNOR y se mantuvo a 25 °C con una ligera aireación con ayuda de una bomba de acuario. A partir de entonces, se procedió a monitorear el desarrollo de los embriones. Al iniciarse la etapa de gastrulación, los embriones fueron transferidos de manera individual, a multiplacas de poliestireno de 48 pozos, de acuerdo a las experiencias

de varios autores (Bergh *et al.*, 1992; Bergh, 1999; Panini *et al.*, 2001; Makridis *et al.*, 2005).

#### 4.3.2 JUVENILES DE *Mycteroperca rosacea*

Veintiséis juveniles, aparentemente sanos de cabrilla sardinera fueron proporcionados del Sistema de cultivo de cabrilla existente en el CIBNOR. El peso de los juveniles estuvo en un intervalo comprendido ente 4.5-15.1 g y en una longitud de 7.0-10.5 cm.

Los peces fueron trasladados al Sistema de Experimentación de la cabrilla sardinera del CIBNOR, donde fueron distribuidos en seis tanques cilíndricos de manera aleatoria, dichos tanques estaban formando parte de un sistema cerrado, como se describe a continuación.

El sistema cerrado estuvo compuesto por seis tanques cilíndricos de 300 litros de capacidad con aireación en cada uno de ellos y conectados por medio de una tubería. Así también, el sistema comprendió de tres tipos de filtros, mecánico, biológico y de luz ultravioleta (UV), un tanque de sedimentación y un tanque para almacenar agua filtrada.

El agua utilizada se bombeaba directamente del mar y se transfería a un tanque Rotoplax de 5,000 l de capacidad, donde era almacenada para proveer al sistema cerrado. Del tanque, el agua de mar pasaba primero a través de cartuchos de 1, 10 y 100 micras, después por medio de una bomba, el agua continuaba a un filtro biológico para enseguida pasar a un filtro mecánico de arena y por ultimo a un filtro de luz UV. El agua así filtrada, pasaba a los tanques. El material de desecho de todos los tanques se depositaba en un tanque de sedimentación. Por otra parte, la limpieza de los tanques se hizo por sifoneo, así como por medio de una red con la que se recogieron los restos de alimento.

En cada uno de los tanques se colocaron cuatro peces, a excepción de uno donde se colocaron hasta seis peces. Los peces se mantuvieron en periodo de aclimatación durante 13 días a una temperatura promedio de 26.7 °C y una concentración de oxígeno disuelto en agua de 5.8 mg/l, así como una salinidad promedio de 30.08 ppm. Estos parámetros fueron medidos y monitoreados durante todo el experimento con ayuda de un equipo multipruebas YSI 556 MPS.

Los peces fueron mantenidos a un fotoperiodo de 8:16 (L:O). El alimento que se proporcionó a los juveniles, fue alimento inerte comercial, el cual se suministró tres veces al día “*ad libidum*”, durante cada tres horas, con el inicio a las diez de la mañana.

Durante la etapa de aclimatación se registraron cuatro decesos.

#### 4.4 INFECCIÓN EXPERIMENTAL Y RECOLECCIÓN DE ESPECIMENES

La sensibilidad de la cabrilla sardinera a la infección por *Aeromonas hydrophila*, fue probada en dos de sus periodos de vida: embrión (fases embrión y embrión libre) y juvenil.

##### 4.4.1 PERIODO EMBRIONARIO: FASE DE EMBRIÓN, INFECCIÓN POR EXPOSICIÓN DIRECTA

Durante este periodo inicial de vida, se realizaron dos experimentos, uno en el cual la bacteria se expuso veinte horas, tiempo en el que aun no se presentaba la eclosión y cuya finalidad fue determinar el efecto de la bacteria sobre la envoltura que cubre al embrión, es decir el corion. En el segundo experimento, la bacteria fue expuesta durante veintisiete horas en los embriones, tiempo en el cual ya se había dado el evento de la eclosión y se

tenía más del 50% de embriones libres eclosionados. En este caso, el objetivo fue conocer el efecto bacteriano sobre el porcentaje de eclosión y sobre la fase de embrión libre.

Para el primer experimento, ocho horas después de la fecundación, al comenzar la gastrulación, los embriones fueron colocados individualmente en placas de poliestireno de 48 pozos con ayuda de una pipeta Pasteur estéril. Enseguida, se adicionaron de manera aleatoria 200  $\mu$ l de cada una de las siguientes suspensiones bacterianas:  $1 \times 10^1$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^7$  UFC/ml, por placa y cada una por triplicado. Como testigo negativo, se utilizaron 200  $\mu$ l de agua de mar estéril, también por triplicado. Posteriormente, las placas se incubaron a 25 °C por espacio de 20 horas en una incubadora refrigerada (Marca LAB-LINE, modelo AMBI-HI-LO Chamber, E.U.A.). Al término de este tiempo, los embriones aun sin eclosionar fueron recolectados y depositados a manera de pool en tubos ependorf de 1.5 ml conteniendo como fijador 1 ml de solución de Davison y ácido acético en una proporción de 9:1 para su posterior tratamiento y análisis histológico. Así también, se depositaron otro tanto de embriones, en bolsitas de malla muy fina de nylon con dimensiones de 2.5 x 2.5 cm, las cuales fueron selladas con un cautín y colocadas en un frasco que contenía como fijador Glutaraldehido 2.5 % en solución amortiguadora de Cacodilatos (0.1M; pH=7.4), para su posterior tratamiento y análisis por microscopia electrónica de barrido (MEB).

Para el segundo experimento, la rutina de experimentación fue igual, con la diferencia de que la incubación se mantuvo siete horas mas después de haberse iniciado la eclosión, tiempo en el cual, como se menciona anteriormente, los embriones presentaron un porcentaje superior al 50% de eclosión, la cual fue calculada para cada tratamiento. En este momento, se decidió dar por terminado esta parte del experimento para poder recolectar



especímenes vivos (embriones libres) de cada tratamiento, los cuales se depositaron a manera de pool, en tubos eppendorff de 1.5 ml conteniendo como fijador 1ml de solución de Davison y ácido acético en una proporción de 9:1 para su posterior tratamiento y análisis histológico. Así también, se depositaron embriones libres vivos de manera individual, en bolsitas de malla muy fina de nylon de 2.5x2.5 cm de dimensiones, las cuales fueron selladas con un cautín y colocadas en un frasco con fijador Glutaraldehído 2.5 % en solución amortiguadora de Cacodilatos (0.1M; pH=7.4), para su posterior tratamiento y análisis por MEB.

#### 4.4.2 PERIODO EMBRIONARIO: FASE DE EMBRIÓN LIBRE, INFECCIÓN POR EXPOSICIÓN DIRECTA

Los embriones fueron transferidos al inicio de la gastrulación, en 15 placas de poliestireno de 48 pozos, a cada uno de los pozos se les adicionaron 180 µl de agua de mar estéril y se dejaron incubar a 25 °C en una incubadora refrigerada (Marca LAB LINE, modelo AMBI-HI-LO Chamber, E.U.A.), durante 24 horas, tiempo en el cual ya habían transcurrido cuatro horas de haberse iniciado la eclosión. En seguida se procedió a realizar la infección experimental, la cual consistió en adicionar 20 µl de cada suspensión bacteriana superior a la que se necesitaba, para que al adicionarse a los 180 µl de agua de mar que ya contenía cada pozo de las placas, se tuviera la concentración deseada tal y como se muestra en la tabla II. El objetivo de este bioensayo fue poder evaluar el efecto bacteriano sobre la fase de embrión libre, así como la concentración letal media (LC<sub>50</sub>). En este caso, también se monto cada tratamiento por triplicado, incluyendo el control negativo y el experimento se

concluyo al pasar de la fase de embrión libre a la fase de apterolarva, correspondiente al periodo larvario, la cual se presenta cuando se ha absorbido completamente el saco vitelino. Este evento ocurrió 63 horas después de haberse llevado a cabo la infección.

Tabla II. Esquema de infección directa en embriones libres de cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* infectados con suspensiones de *Aeromonas hydrophila*.

Número de placas con embriones libres suspendidos en 180 µl de agua de mar estéril	Suspensión bacteriana (20 µl)	Agua de mar estéril (20 µl)	Concentración bacteriana final en cada pozo de las microplacas
3	-	si	0 (control)
3	1x10 <sup>2</sup> UFC/ml	-	1x10 <sup>1</sup> UFC/ml
3	1x10 <sup>4</sup> UFC/ml	-	1x10 <sup>3</sup> UFC/ml
3	1x10 <sup>6</sup> UFC/ml	-	1x10 <sup>5</sup> UFC/ml
3	1x10 <sup>8</sup> UFC/ml	-	1x10 <sup>7</sup> UFC/ml

Al concluir el experimento, se recuperaron especímenes vivos (apterolarva) y fueron observados bajo un microscopio óptico de luz visible (modelo BX-41, marca Olympus) a un aumento x40, con la finalidad de observar morfología e integridad en las apterolarvas. Para tal fin, se extrajeron las muestras con ayuda de una pipeta Pasteur y se colocaron en un portaobjetos para su observación. Enseguida, se tomaron imágenes de los especímenes de cada uno de los tratamientos con ayuda de una cámara CoolSNAP-PRO, montada en el microscopio y se obtuvieron las imágenes de las apterolarvas, las cuales fueron procesadas en un analizador de imágenes Image-Pro-Plus ver. 5.1 (marca Media Cybernetics).

Por otra parte, se recolectaron especímenes a manera de pool, en tubos eppendorff que contenían los mismos fijadores que se utilizaron en el experimento correspondiente a la fase de embrión con el fin de ser utilizados para su posterior análisis histológico y por microscopia electrónica de barrido.

#### 4.4.3 PERIODO JUVENIL: INFECCIÓN INTRAPERITONEAL

Para este bioensayo, las concentraciones bacterianas de la cepa Ah-315 de *Aeromonas hydrophila*, utilizadas fueron:  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  UFC/ml.

La distribución de los tanques para la infección de los peces, se escogió de manera aleatoria y la inoculación se realizó por vía intraperitoneal con ayuda de jeringas de insulina. Cada pez fue inoculado con 100  $\mu$ l de la suspensión a probar, de acuerdo al esquema que se muestra en la tabla III.

Tabla III. Esquema de inoculación intraperitoneal en juveniles de cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* infectados con *Aeromonas hydrophila*.

Tanque	Inóculo (0.1 ml.)	Número de peces
1	$1 \times 10^5$ UFC/ml	4
2	$1 \times 10^8$ UFC/ml	4
3	$1 \times 10^6$ UFC/ml	4
4	SSE	3
5	Sin tratamiento	3
6	$1 \times 10^7$ UFC/ml	4

Donde SSE = Solución salina estéril

Después de realizar la infección en los peces, se dejaron transcurrir ocho días más el experimento y se llevo a cabo la misma rutina de manutención y alimentación que durante la aclimatación. Durante este tiempo se registro el comportamiento y los signos que presentaron los juveniles, así como la sobrevivencia diaria.

Con el objetivo de evaluar la patogenicidad de la bacteria sobre el periodo juvenil de *Mycteroperca rosacea*, durante y al término del experimento, se consideraron los siguientes estudios:

#### 4.4.3.1 ESTUDIO HEMATOLÓGICO

Para determinar los siguientes parámetros hematológicos: concentración de hemoglobina, cuenta total de leucocitos y lectura de fórmula leucocitaria, se tomo la muestra de sangre de la vena caudal de los peces aun con vida, utilizando jeringas de insulina previamente heparinizadas. Las muestras se recolectaron en tubos pediátricos Vacutainer, con la adición de EDTA como anticoagulante en las paredes internas del tubo.

La hemoglobina fue determinada siguiendo el método de la cianometahemoglobina, el cual consistió en depositar 2  $\mu$ l de sangre en 500  $\mu$ l de reactivo de cianometahemoglobina y después de cinco minutos de incubación a temperatura ambiente, se colocaron 200  $\mu$ l de cada mezcla de reacción en los pocillos de una microplaca y enseguida se tomaron las lecturas de absorbancia en un espectrofotómetro BioRad Mod. 3550-UV a una longitud de onda de 454 nm. La concentración de hemoglobina de cada muestra fue calculada con los datos de una curva estándar de hemoglobina realizada previamente.

La cuenta total de leucocitos fue determinada con una cámara de Neubauer, para lo cual primero se diluyo la muestra de sangre con ácido acético al 2 % utilizando una pipeta de

Thoma donde se obtuvo una dilución 1:20. Posteriormente después de agitar la pipeta durante 60 segundos, en un agitador para pipetas de Thoma, se desecharon las primeras tres gotas y se procedió a llenar la cámara por capilaridad. Por ultimo, se dejaron dos minutos para que se sedimentaran las células para poder evaluar el conteo de leucocitos en un microscopio óptico a un aumento de x100, en los cuatro cuadrantes de los extremos de la cámara. El cálculo se realizo de acuerdo a la siguiente formula:

$$\text{Leucocitos} = \frac{\text{No de leucocitos contados} \times \text{factor de dilucion (20)} \times 10^*}{\text{No. de cuadrantes contados (4)}} \dots\dots\dots(1)$$

\*10 = factor que transforma la superficie de los mm<sup>2</sup> (1/10 mm<sup>3</sup>) a volumen en mm<sup>3</sup>

Para el conteo diferencial de la formula leucocitaria, se prepararon al menos tres extensiones de sangre por juvenil estudiado, en portaobjetos limpios, para lo cual se deposito una gota de sangre en el extremo del portaobjetos y con otro se realizo la extensión en sentido contrario y en un ángulo aproximado de 45 °. Los frotis sanguíneos se dejaron secar y posteriormente se fijaron con una solución de metanol absoluto por espacio de dos minutos. Posteriormente se tiñeron con la tinción de Giemsa y por ultimo fueron observados en un microscopio óptico a un aumento de x1000 registrándose los diferentes tipos de leucocitos en 100 células contadas para cada laminilla observada. La morfología de las diferentes células que se observaron fue descrita de acuerdo a los criterios de Catton (1951) y Ellis (1977).

#### 4.4.3.2 ESTUDIO MICROBIOLÓGICO.

##### **a) Muestra microbiológica de riñón, hígado e intestino, con el objetivo de corroborar dos de los postulados de Koch, de acuerdo a lo propuesto por Villamil *et al.* 2003**

Para tal fin, después de tomar la muestra sanguínea a los peces, se sacrificaron y posteriormente se realizó la disección de cada pez en condiciones asépticas, en una campana de flujo laminar, para la extracción de los órganos de interés. Enseguida, se cortó un fragmento pequeño de cada órgano y se pasó sobre un área pequeña en el agar de dos medios selectivos, Agar Maconkey para el aislamiento de bacilos Gram negativos y Agar Sangre de Carnero con base de Agar Soya Tripticasa y ampicilina para el aislamiento de bacterias del género *Aeromonas*. Posteriormente los inóculos fueron sembrados con un asa bacteriológica estéril, por estría cruzada. Por último, todos los medios fueron incubados por 24 horas a 35 °C en una incubadora. Después de este tiempo, se revisaron los medios y aquellos donde desarrollaron colonias lactosa negativa en medio de Agar Maconkey, así como colonias con presencia de Beta hemólisis en el medio de Agar Sangre de Carnero con base de Agar Soya Tripticasa y ampicilina, se tomó con un asa estéril, una muestra de la colonia de cada caja y se realizó las pruebas de catalasa y oxidasa así como un frotis Gram para verificar morfología colonial. Todas las colonias que dieron positiva ambas pruebas y que en el frotis Gram se observaron como cocobacilos Gram negativos, fueron sembradas nuevamente en un medio de Agar Maconkey e incubadas nuevamente a 35 °C por 24 horas.

## **b) Identificación Bioquímica y Molecular**

Las cepas aisladas fueron identificadas por pruebas bioquímicas en un equipo automatizado (Marca Biomeriux modelo Vitek, Francia). El procedimiento fue el mismo, que se utilizó cuando se verificó la pureza de la cepa *Aeromonas hydrophila* Ah-315.

Para la identificación molecular de las cepas aisladas de los órganos infectados, mediante la técnica de PCR, se siguieron los siguientes pasos:

Primero se llevó a cabo la extracción de ADN de las cepas aisladas así como de la cepa con la que se realizó la infección. Para tal fin se utilizó el kit Fast DNA de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Después, se realizó el corrimiento electroforético de los extractos de ADN en un gel de agarosa al 1%, con 3  $\mu\text{l}$  de cada muestra de los extractos obtenidos y 2  $\mu\text{l}$  de un marcador molecular de 500 pares de bases. El voltaje utilizado para este fin, fue de 80 volts por espacio de 65 minutos. Así también, se procedió a cuantificar las concentraciones de ADN con ayuda del aparato Eppendorf BioPhotometer, previa preparación de las muestras (2  $\mu\text{l}$  de extracto de ADN + 58  $\mu\text{l}$  de agua destilada). Posteriormente, se llevó a cabo la amplificación de los extractos de ADN por medio de la técnica de PCR utilizando un termociclador (Marca Gene Amp, modelo PCR System 2700, E.U.A.). El volumen total de cada reacción fue de 25  $\mu\text{l}$ . que constó de 1  $\mu\text{l}$  de ADN como templado, 2.5  $\mu\text{l}$  de buffer, 0.5  $\mu\text{l}$  de desoxinucleotidotrifosfatos (dNTPs), 1.0  $\mu\text{l}$  de cada cebador (Forward y Reverse), 0.3  $\mu\text{l}$  de Taq ADN polimerasa y 18.7  $\mu\text{l}$  de agua destilada. Se corrieron veinticinco ciclos bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94 °C por cinco minutos, alineamiento a 55 °C por un minuto, extensión a 72 °C por un minuto en cada ciclo. Como controles positivos se corrieron los templados de ADN de la cepa Ah-315 de *Aeromonas hydrophila* y el de la cepa A-186 de *Aeromonas veronii*, así como un control

negativo compuesto de los componentes de la mezcla de reacción excepto el templado de ADN. Cabe señalar que como no fue posible contar con cebadores específicos para *Aeromonas hydrophila*, los cebadores que se utilizaron fueron Forward: Por9K y Reverse:OMP7, que amplifican el gen 48 de la cepa A-186 de *Aeromonas veronii*.

Por último los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, con 5 µl de cada muestra y 2 µl de un marcador molecular de 500 pares de bases. El voltaje utilizado fue de 70 volts por espacio de 65 minutos.

#### 4.4.3.3 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

##### 4.4.3.3.1 Muestras de tejido de riñón, hígado e intestino para la evaluación histopatológica

Se realizaron cortes de menos de 1 cm de largo de los órganos de interés (riñón, hígado e intestino) de cada pez y se colocaron en una canastilla histológica debidamente etiquetada. Posteriormente, fueron colocadas dentro de un frasco conteniendo solución de Davison y ácido acético en proporción 9:1 por 48 horas y después de este tiempo se pasaron a alcohol etílico al 70% y fueron entregadas al Laboratorio de Histología del CIBNOR para continuar con el proceso histológico correspondiente.

Durante el desarrollo del experimento se tuvieron un total de seis peces muertos, a todos se les tomo muestras para histología y microbiología. Solo a uno se le tomo muestra de sangre para realizar frotis sanguíneo.



## 4.5 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

### 4.5.1 PROCESO HISTOLOGICO

#### 4.5.1.1 FASE DE EMBRIÓN, EMBRIÓN LIBRE Y APTEROLARVA

Los especímenes fueron mantenidos 48 horas en tubos Eppendorff conteniendo 1 ml de solución de Davison y ácido acético en una proporción de 9:1, con el objetivo de llevar a cabo el proceso de fijación. Al término de este tiempo, se extrajo el fijador con ayuda de una pipeta Pasteur y se adiciono 1 ml de alcohol al 70 %.

Posteriormente los especímenes fueron llevados al Laboratorio de Histología donde se continuó con la técnica histológica, la cual consistió de los siguientes pasos:

#### **1. Deshidratación y aclaración de las muestras**

Este proceso consistió primero en extraer el alcohol etílico al 70 %, donde se mantenían los especímenes, con ayuda de una jeringa con aguja de calibre 22x22 mm. Enseguida se adiciono 1 ml de alcohol etílico al 80 % y se mantuvieron así por espacio de 30 minutos. Al cabo de este tiempo, se hicieron dos cambios más de alcohol etílico al 90 y 100 % y se dejaron también el mismo tiempo. Enseguida, para llevar a cabo la aclaración de los especímenes, se les extrajo el alcohol etílico al 100 % y se les adiciono una mezcla de alcohol etílico absoluto y xilol en proporción 1:1 durante 10 minutos. Por último, se les extrajo esta mezcla y se les adiciono xilol absoluto y se dejaron así por 5 minutos.

#### **2. Infiltración en parafina**

Una vez deshidratadas y aclaradas las muestras, se procedió a llevar a cabo la infiltración con parafina. Primero, se extrajo el xilol a cada muestra de la misma manera que en la

deshidratación, después con ayuda de una pipeta Pasteur, se procedió a adicionar a cada muestra una serie de parafinas fundidas mantenidas dentro de una incubadora (modelo 1500 E, marca VWR Scientific) a 60 °C. La primera adición se hizo con una mezcla de parafina-xilol en una proporción 1:1 durante 10 minutos. Pasado este tiempo se extrajo esta mezcla y se les adicionaron tres parafinas más donde permanecieron 30 minutos en cada una de ellas para completar este proceso.

### **3. Inclusión en bloques**

Las muestras fueron incluidas en bloques de parafina con ayuda de un centro de inclusión (Histoembedder, marca Leica).

### **4. Corte de los especímenes y montaje**

Después de haber confeccionado cada bloque conteniendo los diferentes especímenes, se procedió a realizar cortes de 4  $\mu$  de diámetro con un microtomo de rotación (modelo RM 2155, marca Leica). Posteriormente, cada corte seleccionado se colocó en un portaobjetos y se dejaron caer unas gotas de alcohol debajo de este, con el fin de que se extendiera para enseguida introducirlo en un baño de flotación de tejidos (modelo Lo-Boy, marca Lab-Line) conteniendo agua y 0.10 % de gelatina pura por litro, a una temperatura de 43-45 °C. Después se procedió a seleccionar cada listón de los cortes y recogerlo con la ayuda de un portaobjetos para quedar montado sobre este. Los cortes de los tejidos ya montados, se colocaron sobre una charola, se cubrieron y se dejaron secar por 24 horas.

## **5. Tinción de las laminillas con la técnica de Hematoxilina y Eosina**

Las laminillas obtenidas fueron teñidas con la Técnica de Hematoxilina Eosina, en un equipo automatizado para tinción (modelo ST 5020, marca Leica).

## **6. Montaje permanente**

El montaje, se realizo con resina sintética y se tuvo el cuidado de que no se formaran burbujas de aire.

### **4.5.1.2 PERIODO JUVENIL: ÓRGANOS RIÑÓN, HÍGADO E INTESTINO**

Los cortes histológicos de los órganos mantenidos en alcohol al 70 % dentro de canastillas histológicas, fueron deshidratados por inmersión en diferentes concentraciones de alcohol etílico por espacio de una hora en cada una de ellas (80, 90 y 100 %). Posteriormente fueron aclarados al transferirlos en una solución de alcohol etílico absoluto y xilol en una proporción 1:1 por espacio de 20 minutos. Enseguida, se transfirieron en una solución de xilol absoluto por 8 minutos. Una vez deshidratadas y aclaradas las muestras, se procedió a llevar a cabo la infiltración con parafina que consistió en sumergir las muestras, contenidas en las canastillas histológicas, en diferentes parafinas fundidas mantenidas dentro de una incubadora (modelo 1500 E, marca VWR Scientific) a 60 °C. La primera inmersión se hizo en una mezcla de parafina-xilol en una proporción 1:1 durante 25 minutos. Pasado este tiempo se transfirieron, con la ayuda de una espátula metálica tibia, a tres parafinas mas permaneciendo una hora en cada una de ellas. Posteriormente las muestras fueron incluidas en bloques de parafina con ayuda de un centro de inclusión (Histoembedder, marca Leica). Después de haber confeccionado cada bloque conteniendo los fragmentos de órganos

(riñón, hígado e intestino) de cada juvenil, se procedió a realizar cortes de 4  $\mu$  de diámetro con un microtomo de rotación (modelo RM 2155, marca Leica). Posteriormente, cada corte seleccionado se colocó en un portaobjetos y se dejaron caer unas gotas de alcohol debajo de este con el fin de que el listón se extendiera para enseguida introducirlo en un baño de flotación de tejidos (modelo Lo-Boy, marca Lab-Line ) conteniendo agua y 0.10 % de gelatina pura por litro, a una temperatura de 43-45 °C. Después se procedió a seleccionar cada listón de los cortes y recogerlo con la ayuda de un portaobjetos para quedar montado sobre este. Los cortes de los tejidos ya montados, se colocaron sobre una charola, se cubrieron y se dejaron secar por 24 horas. Pasado este tiempo se procedió a teñir las laminillas con la Técnica de Hematoxilina Eosina, en un equipo automatizado para tinción (modelo ST 5020, marca Leica). Después de teñir las laminillas se realizó el montaje permanente con resina sintética.

#### 4.5.1.3 INTERPRETACIÓN HISTOLÓGICA

Con ayuda de una cámara CoolSNAP-PRO, montada en un microscopio óptico (modelo BX-41, marca Olympus), se obtuvieron las imágenes de los diferentes cortes histológicos y fueron procesadas en un analizador de imágenes Image-Pro-Plus ver. (marca Media Cybernetics).

Las imágenes de los cortes histológicos del periodo embrionario y larval fueron descritas con ayuda de diversos autores (Peña *et al.*, 2003; Hall *et al.*, 2004; Falk-Petersen, 2005). Así también, las imágenes de los cortes histológicos de los órganos de los juveniles, fueron comparadas de acuerdo a diversos autores (Groman, 1982; Yasutake y Wales, 1983; Hibiya *et al.*, 1984; Estrada-Flores y Uribe-Aranzábal, 2002).

#### 4.5.2 EVALUACIÓN POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

##### **a) Preparación de los especímenes**

Los especímenes recolectados a manera de juego en bolsas de nylon de malla muy estrecha con dimensiones de 2.5x2.5 cm, fueron fijados por inmersión en un frasco conteniendo Glutraldehído 2.5 % en solución amortiguadora de Cacodilatos (0.1M; pH=7.4) por espacio de tres horas. Posteriormente se llevo acabo la deshidratación de los especímenes de acuerdo a la siguiente rutina:

1. Remover fijador
2. Realizar dos lavados con agua destilada de 15 minutos cada uno
3. Remover el agua
4. Agregar etanol al 30 % y dejar reposar 15 minutos
5. Retirar el etanol al 30 % y repetir el paso anterior
6. Retirar etanol al 30 %
7. Agregar etanol al 50 % y dejar 15 minutos
8. Retirar el etanol al 50 % y repetir el paso anterior
9. Retirar el etanol al 50 % y agregar etanol al 70 %, dejar 15 minutos
10. Retirar etanol al 70 %
11. Adicionar nuevamente etanol al 70 % y mantener a 4 °C

Los especímenes de los diferentes tratamientos contenidos en etanol al 70 %, fueron tratados como se describe a continuación, para poder ser observados en el microscopio electrónico de barrido. Como primer pasó, se procedió a eliminar el agua de las muestras casi en su totalidad, para lo cual, las bolsitas conteniendo las muestras, fueron transferidas a

un frasco conteniendo etanol al 96 % y se dejaron en esta solución por espacio de 20 minutos. Enseguida, por decantación fue desechado el alcohol y se adiciono alcohol al 96 y amiloacetatos en partes iguales. Se dejo reposar nuevamente por 20 minutos. Pasado este tiempo se retiro esta solución y las bolsitas conteniendo los especimenes se colocaron sobre una toalla de papel con la finalidad de eliminar el exceso de la solución. Posteriormente, fueron introducidas en un frasco conteniendo solo amiloacetatos y se dejaron en esta solución 20 minutos. Al término de este tiempo, se elimino esta solución por decantación y se adiciono nuevamente la solución de amiloacetatos dejándose 20 minutos más en dicha solución. Por ultimo, se retiro el amiloacetato y cada bolsita conteniendo los especimenes se colocó sobre una toalla de papel para eliminar el exceso.

Después de la deshidratación, las muestras fueron desecadas por el método de punto crítico con CO<sub>2</sub>, usando un desecador de punto crítico Sandri-PVT-3B (Tousimis research corporation) a una temperatura de 33.4 °C y a una presión de 74.5 atmósferas por espacio de 45 minutos. Pasado este tiempo, las muestras se extrajeron de las bolsitas y se colocaron sobre la parte inferior de una caja de petri (cada tratamiento por separado) para poder ubicarlas con ayuda de un microscopio estereoscópico. Posteriormente las muestras de cada tratamiento fueron montadas en portaespecimenes de Aluminio a manera de pull para ser recubiertas con Platino en un cobertor iónico Desk II, durante 45 segundos.

Los especimenes fueron observados y fotografiados usando un microscopio electrónico de barrido (Marca Hitachi, modelo S-3000N, Japón).

## 4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### 4.6.1 PERIODO EMBRIONARIO: FASE DE EMBRIÓN

El porcentaje de eclosión de los embriones se calculo de acuerdo a la relación siguiente:

$$\text{Porcentaje de eclosión} = \frac{\# \text{ embriones eclosionados} \times 100}{\# \text{ embriones sembrados}} \dots\dots\dots(2)$$

### 4.6.2 PERIODO EMBRIONARIO: FASE DE EMBRIÓN LIBRE

A las 23 horas de haberse llevado a cabo la infección; cuando comenzaba la eclosión de los embriones, se calculo el porcentaje de eclosión con la formula descrita anteriormente y con el fin de determinar la LC<sub>50</sub>, se realizo la primera observación de los embriones libres para registrar la mortalidad de esta fase en cada uno de los tratamientos incluyendo el control, así como para cada una de las réplicas. Posteriormente se realizo la segunda observación a las diez horas y después cada seis horas, hasta completar las 63 horas, que fue cuando se dio por terminado el experimento, una vez que los individuos completaron la absorción del saco vitelino y presentaron la boca abierta y los ojos pigmentados (Balon, 2002).

Los datos de % de eclosión del embrión, fueron tratados por la transformación Arco seno y posteriormente se probo la normalidad de los datos por medio de la prueba Kolmogorov-Smirnov, así como la homogeneidad de la varianza por medio de la prueba de Barlett. Como no se cumplieron los supuestos de la normalidad, las diferencias estadísticas fueron determinadas por la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Sokal y Rohlf, 1981).

Las diferencias en el porcentaje de mortalidad de los embriones libres entre el grupo control y los tratamientos fueron comparados usando la comparación multiple de Dunnett. La

concentración letal media ( $LC_{50}$ ) de los embriones libres y sus límites de confianza al 95% fueron calculados por el método de transformación Probit.

#### 4.6.3 PERIODO JUVENIL

En el caso del periodo juvenil, los datos de los parámetros hematológicos, fueron tratados de forma similar a las fases de embrión y embrión libre.

Todos los análisis se realizaron con ayuda del paquete STATISTICA 6.1.



concentración letal media ( $LC_{50}$ ) de los embriones libres y sus límites de confianza al 95% fueron calculados por el método de transformación Probit.

#### 4.6.3 PERIODO JUVENIL

En el caso del periodo juvenil, los datos de los parámetros hematológicos, fueron tratados de forma similar a las fases de embrión y embrión libre.

Todos los análisis se realizaron con ayuda del paquete STATISTICA 6.1.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 PUREZA DE LA CEPA UTILIZADA EN LOS DIFERENTES BIOENSAYOS.

La pureza de la cepa Ah-315 de *Aeromonas hydrophila* empleada en este trabajo, fue corroborada de acuerdo a los caracteres fenotípicos que se presentan en la tabla IV.

Con respecto a la prueba de PCR, fue posible amplificar un fragmento del ADN de la cepa Ah-315 con los cebadores utilizados, comprobándose molecularmente su pureza por medio de esta prueba como se muestra en la figura 1 y donde se puede apreciar que la fracción de ADN amplificada corresponde aproximadamente a 1,200 pares de bases.

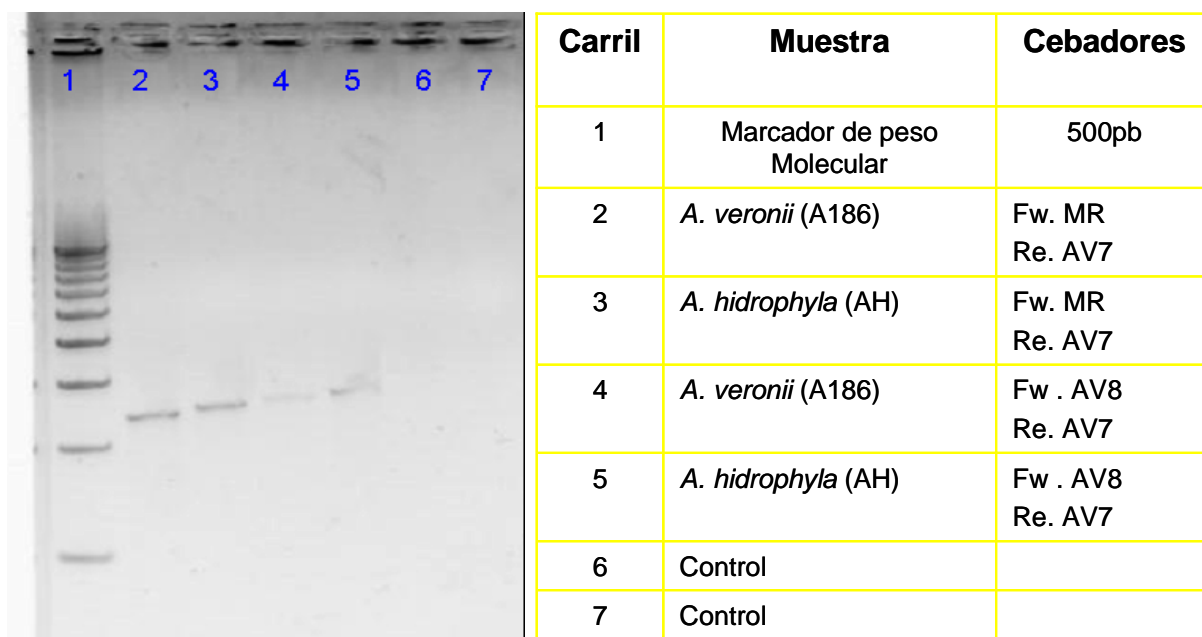


Figura 1. Amplificación de ADN con los cebadores Fw: MR y Re: AV7, donde se observa el número aproximado de pares de bases correspondiente a *Aeromonas veroni* (A186) y *A. hydrophila* (Ah-315).

Tabla IV. Características fenotípicas de la cepa Ah-315 *Aeromonas hydrophila*.utilizada en el presente trabajo.

	<i>Ah-315 Aeromonas hydrophila</i>
Oxidasa	+
Catalasa	+
Tinción de Gram	-
Gas de glucosa	+
Descarboxilación de:	
Lisina	-
Ornitina	-
Producción de:	
Indol	+
H <sub>2</sub> S de tiosulfato	-
Indoxil-beta-D-glucósido	+
Hidrólisis de:	
Esculina	+
Urea	-
Orto-nitrofenil-beta-D-galactopiranosida	-
Ácido de:	
Arabinosa	-
Lactosa	-
Sacarosa	+
Inositol	-
Manitol	+
Rafinosa	-
Adonitol	-
Ramnosa	+
Sorbitol	-
Glucosa, lactosa, maltosa, manitol y xilosa	+
Utilización de:	
Acetato	-
Arginina	+
Citrato de Simmons	-
Tryptófano	-
Maltosa	+
Xilosa	-
Resistencia a:	
Polimixina	-
p-coumarico	+
dp300 (2,4,4Tricloro,2-hidroxi-difenileter)	+

## 5.2 INFECCIONES EXPERIMENTALES

### 5.2.1 PERIODO EMBRIONARIO: FASE DE EMBRIÓN

#### 5.2.1.1 TASA DE ECLOSIÓN

En la tabla V se muestran los porcentajes de eclosión de los embriones sometidos a las diferentes concentraciones de la cepa Ah-315 de *Aeromonas hydrophila*, a las 20 horas después de la infección. En esta fase, se observó que la cepa Ah-315 de *Aeromonas hydrophila* no tuvo efecto sobre la eclosión en los embriones, pues no hubo diferencia significativa entre los diferentes tratamientos a excepción de una de las replicas correspondientes a la infección  $1 \times 10^1$  UFC/ml, donde se obtuvo un porcentaje de eclosión mas bajo que el resto de las replicas.

Tabla V. Porcentaje de eclosión de los embriones sometidos a diferentes concentraciones bacterianas de *Aeromonas hydrophila* por espacio de 27 horas.

<b>Tratamiento</b>	<b>Tasa de Eclosión</b>
Control-A	70
Control-B	73
Control-C	85
$1 \times 10^1$ UFC-A	75
$1 \times 10^1$ UFC-B	39.5
$1 \times 10^1$ UFC-C	60
$1 \times 10^3$ UFC-A	58
$1 \times 10^3$ UFC-B	57
$1 \times 10^3$ UFC-C	56
$1 \times 10^5$ UFC-A	72
$1 \times 10^5$ UFC-B	60
$1 \times 10^5$ UFC-C	60
$1 \times 10^7$ UFC-A	68
$1 \times 10^7$ UFC -B	85
$1 \times 10^7$ UFC -C	89

#### 5.2.1.2 CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (LC<sub>50</sub>)

Debido a que la tasa de eclosión no mostró diferencia significativa en ninguno de los tratamientos con respecto al control, no fue posible calcular la LC<sub>50</sub> en la fase de embrión.

#### 5.2.1.3 HISTOLOGÍA DE LA FASE DE EMBRIÓN

En las laminillas histológicas de los embriones expuestos a las diferentes concentraciones de la cepa Ah-315 de *Aeromonas hydrophila* teñidas por la técnica de Hematoxilina y Eosina (H y E), pudo observarse que el embrión presentaba saco vitelino y el periblasto se encontraba unido al ectodermo, como se muestra en las imágenes de la figura 2A-E, donde el embrión se tiñó del color morado y el saco vitelino de color rosa.

Antes de llevarse a cabo la infección, se observó que los embriones estaban menos desarrollados, ya que las estructuras aun estaban en el proceso de organogénesis. Con respecto a los embriones sometidos a las diferentes concentraciones de la bacteria.

*Aeromonas hydrophila*, en general se observaron más desarrollados pero sin alteraciones histológicas, a excepción del tratamiento  $1 \times 10^7$  UFC/ml (Fig. 2E) donde hubo el 100% de los embriones fraccionados. En el caso de los embriones control, no fue posible obtener imágenes ya que durante el proceso histológico los especímenes se perdieron.

#### 5.2.1.4 ULTRAESTRUCTURA DE LA FASE DE EMBRIÓN

En las imágenes obtenidas por MEB de los embriones, se puede apreciar la ornamentación del corión, la cual está caracterizada por una superficie porosa. Por otra parte, también se

distinguió el micrópilo, que es la estructura donde penetran los espermatozoides para llevarse a cabo la fecundación.

En los embriones del tratamiento  $1 \times 10^7$  UFC/ml se localizaron un gran número de bacterias (Fig. 3E), que contrasta con los embriones de los otros tratamientos antes de infectar y con los de la infección  $1 \times 10^3$  UFC/ml (Figs. 3A-C), donde no hubo bacterias. Así también, se puede apreciar que el diámetro de las bacterias es igual que el de los poros del corión. Por otra parte, en algunas imágenes, se localizaron bacterias en el área del micrópilo (Figs. 3A y 3C).

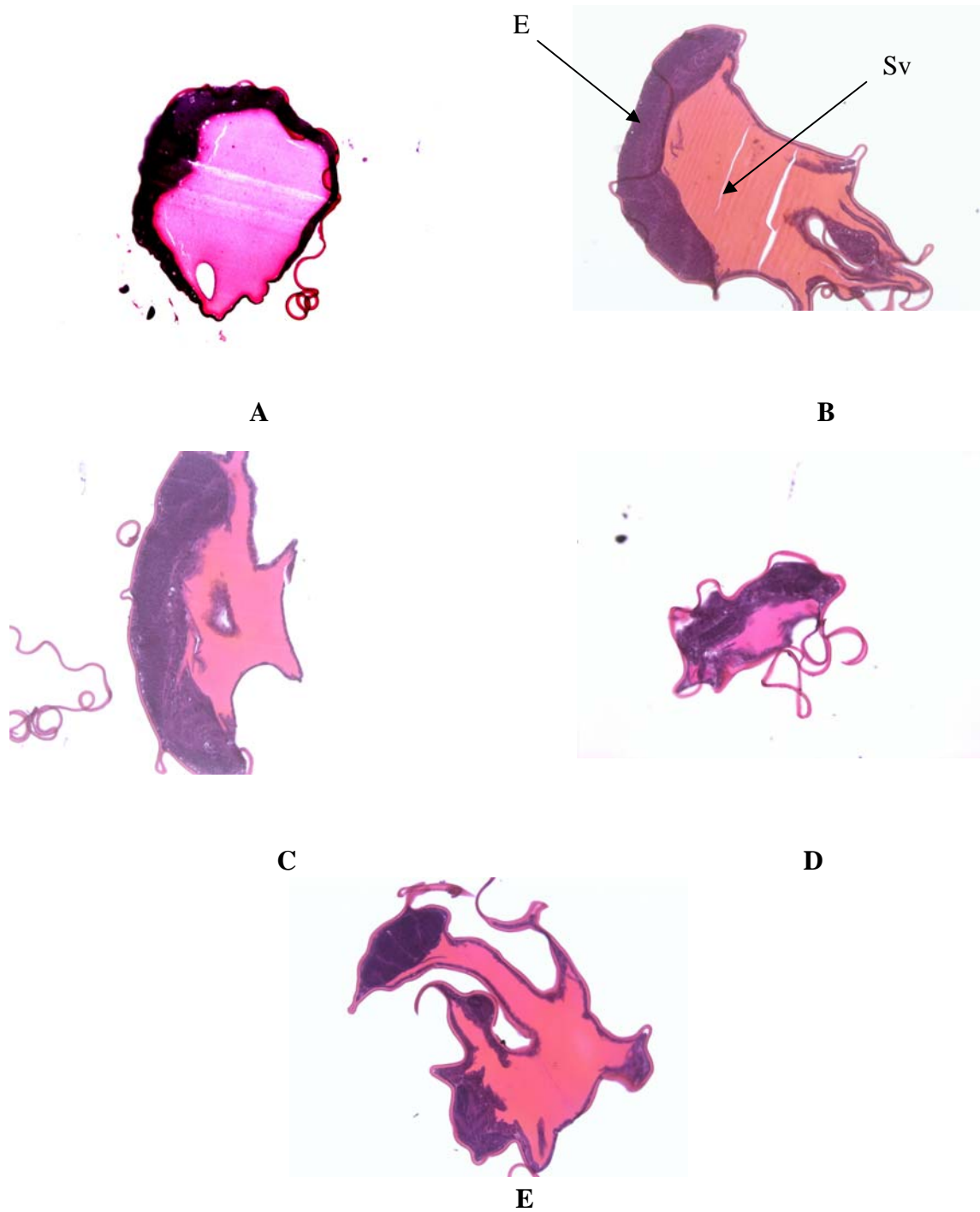
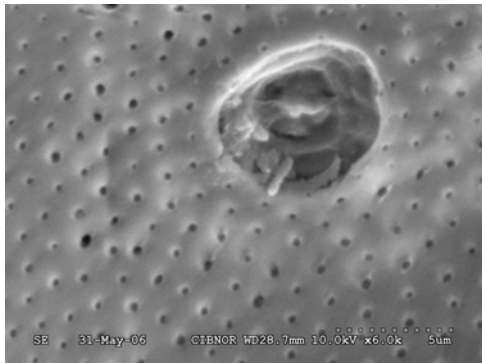
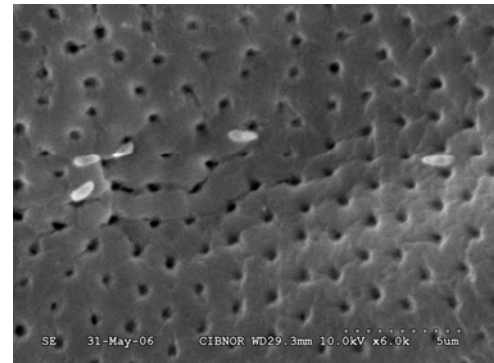


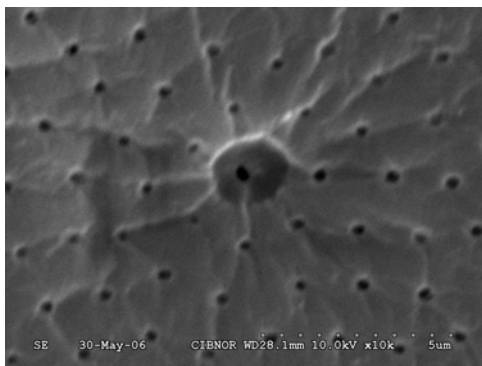
Figura 2. Morfología de embriones de *Mycteroperca rosacea* sometidos a tratamiento control e infectados con la cepa Ah-315 de *Aeromonas hydrophila*. A) Embrión del tratamiento control, técnica HE, x200; B) Embrión infectado con  $1 \times 10^1$  UFC/ml, técnica HE, x200; C) Embrión infectado con  $1 \times 10^3$  UFC/ml, técnica HE, x200; D) Embrión infectado con  $1 \times 10^5$  UFC/ml, técnica HE, x200; E) Embrión infectado con  $1 \times 10^7$  UFC/ml, técnica HE, x200. E, embrión; Sv, saco vitelino.



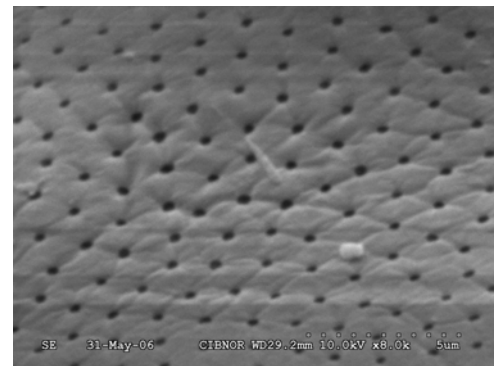
A



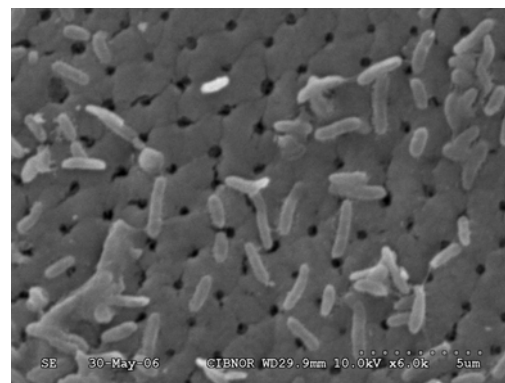
B



C



D



E

Figura 3. Micrografías de MEB de la superficie de embriones de *Mycteroperca rosacea* de tratamiento control e infectados con la cepa Ah-315 de *Aeromonas hydrophila*. A) Embrión correspondiente a tratamiento control, donde se observa una bacteria en el micropilo; B) Embrión infectado con  $1 \times 10^1$  UFC/ml, se observan algunas bacterias adheridas sobre la superficie del corión; C) Embrión infectado con  $1 \times 10^3$  UFC/ml; D) Embrión infectado con  $1 \times 10^5$  UFC/ml; E) Embrión infectado con  $1 \times 10^7$  UFC/ml, donde se observa un gran número de bacterias adheridas sobre la superficie del corión.



## 5.2.2 FASE DE EMBRIÓN LIBRE

### 5.2.2.1 MORTALIDAD ACUMULADA

En la figura 4 se muestran los datos del porcentaje de la mortalidad acumulada, como resultado del efecto de las diferentes concentraciones de la bacteria contra el tiempo después de la infección. En esta gráfica, se observa que la mayor mortalidad se da en las tres replicas de la máxima concentración bacteriana probada, además se distingue una mayor mortalidad en todos los tratamientos y en el control a partir de las 33 horas después de la infección. En todos los tratamientos, esta tendencia se mantiene hasta las 51 horas, posteriormente se observo un ligero incremento, hasta la transformación a la fase de larva preflexión (63 horas después de la infección).

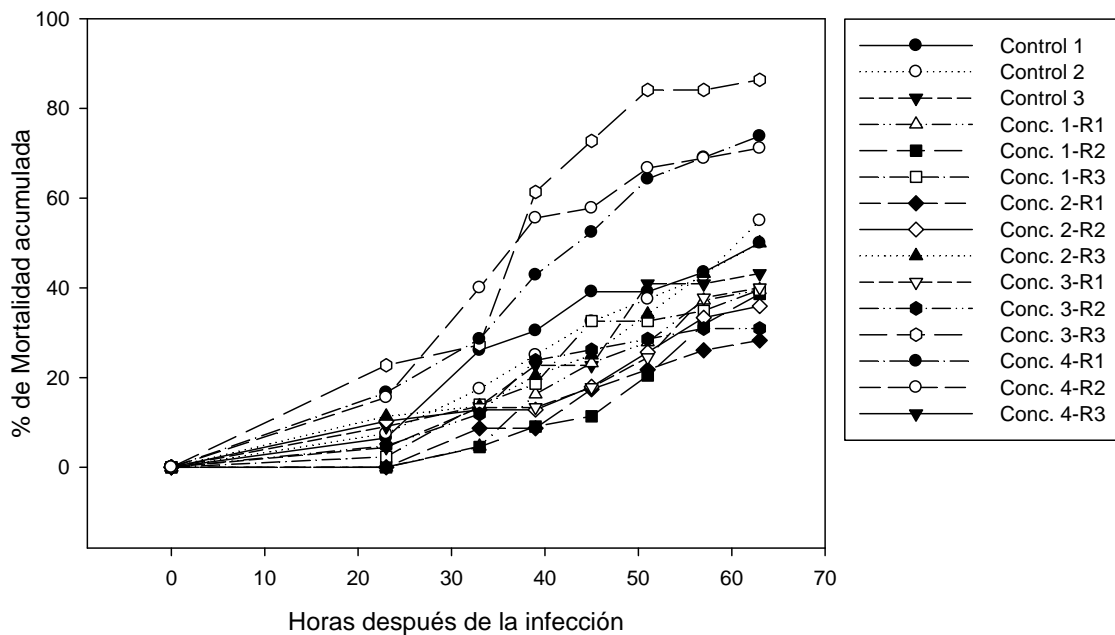


Figura 4. Mortalidad acumulada de embriones libres de *Mycteroperca rosacea*, debida a una infección experimental por *Aeromonas hydrophila* (Ah-315) a diferentes concentraciones. Las cuatro concentraciones son: Conc. 1= $1 \times 10^1$  UFC/ml; conc. 2= $1 \times 10^3$  UFC/ml; conc. 3= $1 \times 10^5$  UFC/ml; conc. 4= $1 \times 10^7$  UFC/ml; R1-R3, replicas.

### 5.2.2.2 CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (LC<sub>50</sub>)

En la tabla VI se observa la comparación de los tratamientos contra el control, de acuerdo a la prueba de Dunnett. De este modo, se encontró que solo en la mayor concentración bacteriana hubo diferencia significativa entre el resto de los tratamientos y el control. Esta situación provoco que el análisis Probit, solo fuera posible aplicarlo a las 23 horas después de la infección.

Tabla VI. Valores promedio y su desviación estándar obtenidos mediante la prueba de Dunnett para comparar las mortalidades de los embriones libres de *Mycteroperca rosacea* expuestos a las diferentes concentraciones de *Aeromonas hydrophila* probadas y el tratamiento control. Las cuatro concentraciones son: Conc. 1=1x10<sup>1</sup> UFC/ml; conc. 2=1x10<sup>3</sup> UFC/ml; conc. 3=1x10<sup>5</sup> UFC/ml; conc. 4=1x10<sup>7</sup> UFC/ml.

Tratamiento	Horas después de la infección													
	23		33		39		45		51		57		63	
	X	d.s.	X	d.s.	X	d.s.	X	d.s.	X	d.s.	X	d.s.	X	d.s.
Control	0.49	0.06	0.17	0.10	0.26	0.04	0.31	0.08	0.36	0.04	0.42	0.01	0.49	0.06
Conc. 1	0.40	0.02	0.08	0.05	0.16	0.07	0.19	0.07	0.30	0.10	0.37	0.05	0.40	0.02
Conc. 2	0.35	0.06	0.12	0.02	0.13	0.05	0.23	0.09	0.27	0.06	0.31	0.05	0.35	0.06
Conc. 3	0.40	0.09	0.13	0.01	0.19	0.05	0.23	0.05	0.29	0.05	0.37	0.06	0.40	0.10
Conc. 4	0.77*	0.08	0.40*	0.11	0.53*	0.10	0.61*	0.10	0.72*	0.11	0.74*	0.09	0.77*	0.08
pD	0.14		0.14		0.13		0.16		0.15		0.11		0.14	

\* diferencia significativa con un 95% de confianza

pD=diferencia mínima detectable para la prueba de Dunnett

La concentración letal media se determinó a las 23 horas después de la infección, con una concentración bacteriana de  $5.37 \times 10^9$  UFC/ml y un intervalo de confianza de ( $1.85 \times 10^8$ - $1.0 \times 10^{20}$ ), que se observan en la Tabla VII. Estos valores promedio y el límite superior, nos indican que el efecto de la máxima concentración bacteriana probada, tiene un efecto poco virulento en la fase de embrión libre.

Tabla VII. Valores de  $LC_{50}$  y resumen de los análisis estadísticos obtenidos 23 horas después de la infección.

Replicas	$LC_{50}$ (UFC/ml)	Límites de confianza (95%)	
		Inferior	Superior
1	$5.37 \times 10^9$	$1.85 \times 10^8$	$1.0 \times 10^{20}$
2			
3			
promedio			

### 5.2.2.3 EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE LA FASE DE EMBRIÓN LIBRE

En las imágenes obtenidas de los cortes histológicos de embriones libres después del tiempo de exposición con la bacteria *Aeromonas hydrophila* de la cepa Ah-315, se logró apreciar algunas estructuras bien definidas como fueron: el notocordio, los bastones oculares, el saco vitelino, el glóbulo de aceite, así como el intestino.

Comparando los cortes histológicos de los embriones libres del grupo control con los de los eleuteroembriones provenientes de los embriones infectados con las diferentes concentraciones de la cepa utilizada, se observó que no hay alteraciones histológicas en los

especímenes de los diferentes tratamientos, como lo muestran las imágenes de las figuras 5A-E.

#### 5.2.2.4 ULTRAESTRUCTURA DE LA FASE DE EMBRIÓN LIBRE

Debido a que no se obtuvieron diferencias en los porcentajes de eclosión de los embriones infectados con las diferentes concentraciones de la cepa utilizada, solo se procesaron los especímenes de dos tratamientos, el control y la infección  $1 \times 10^7$  UFC/ml, para observar diferencias en la ultraestructura por microscopía electrónica de barrido. En el tratamiento control no se observaron bacterias y en las de la infección se lograron apreciar algunas bacterias. Sin embargo no se logró apreciar una diferencia significativa en la superficie del epitelio de los especímenes que distinguiera los dos tratamientos. Por otra parte se observó, en todas las imágenes, unas estructuras redondas que corresponden a los mecanorreceptores llamados técnicamente neuromastos, los cuales fueron observados aun en proceso de formación.

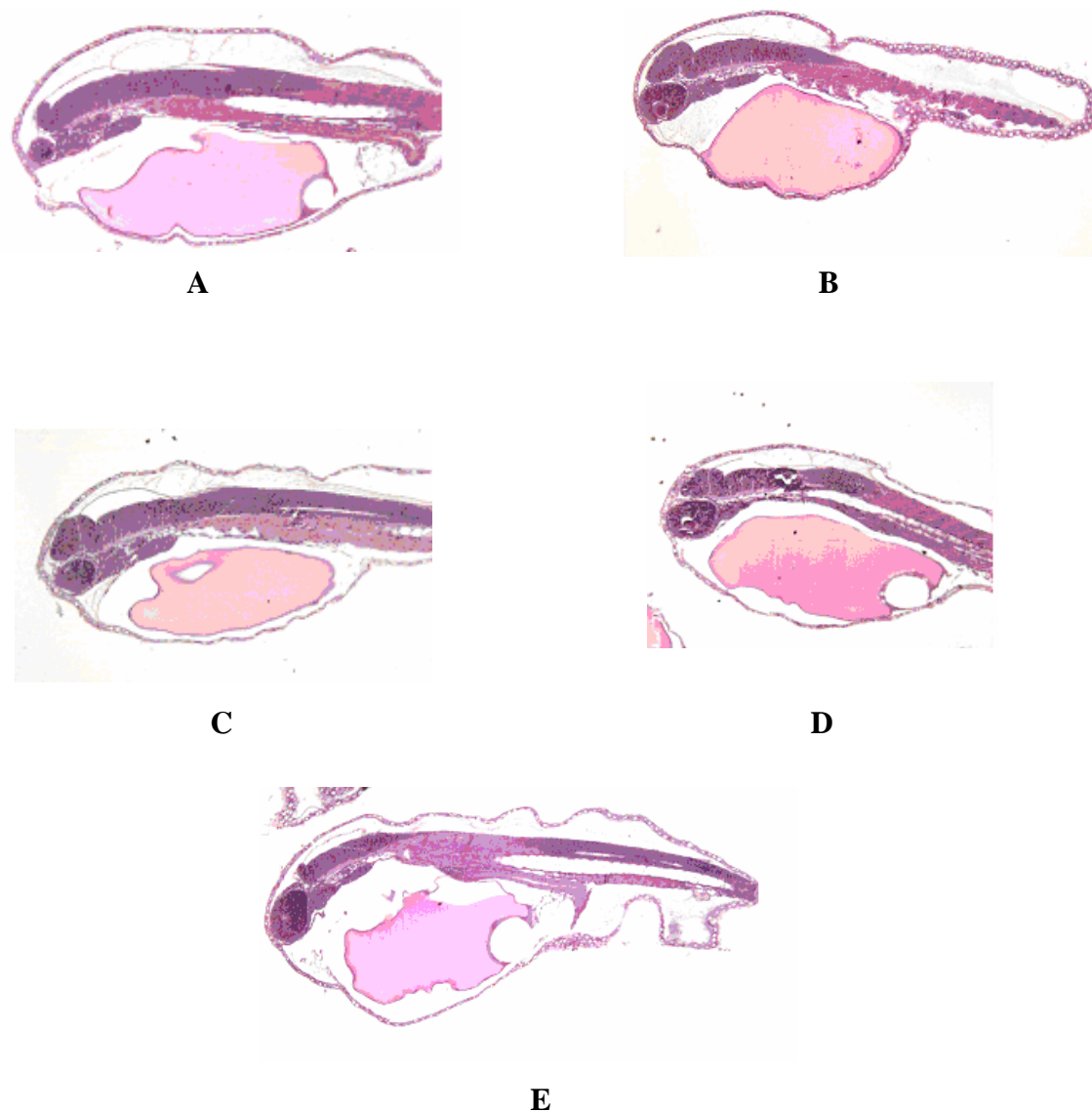


Figura 5. Embriones libres de *Mycteroperca rosacea* eclosionados de embriones infectados con la cepa Ah-315 de *Aeromonas hydrophila*. A) Embrión libre control, técnica HE, x1000; B) Embrión libre infectado con  $1 \times 10^1$  UFC/ml, técnica HE, x1000; C) Embrión libre infectado con  $1 \times 10^3$  UFC/ml, técnica HE, x1000; D) Embrión libre infectado con  $1 \times 10^5$  UFC/ml, técnica HE, x1000; E) Embrión libre infectado con  $1 \times 10^7$  UFC/ml, técnica HE, x1000.

El cambio del periodo embrionario a la fase de apterolarva se dio a las 61 horas después de la eclosión y a 57 horas de haberse practicado la infección. Dentro de los cambios observados al transcurrir este tiempo, fue que todos los especímenes sobrevivientes presentaban los ojos pigmentados y seis horas más tarde, todos los especímenes tenían la boca abierta por lo que, se considero que ya todos los especímenes sobrevivientes habían pasado a la fase de apterolarva y por lo tanto se dio por concluido el bioensayo.

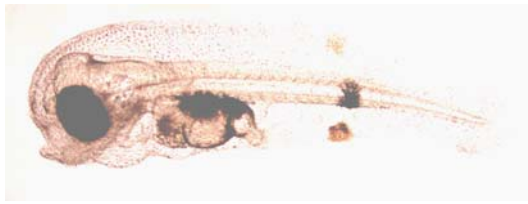
#### 5.2.2.5 MORFOLOGÍA EXTERNA DE APTEROLARVAS

De la muestra de apterolarvas de cada tratamiento, se observo la morfología así como la integridad de los especímenes bajo un microscopio de luz visible a un aumento x40, lográndose apreciar, que todos los especímenes excepto los del tratamiento  $1 \times 10^7$  UFC/ml, mostraron una morfología similar como se muestra en las imágenes de la figuras 6A-D, sin embargo los especímenes del tratamiento de mayor infección, se observaron con deformaciones en un 25 %. Otro hallazgo fue el observar la cola erosionada en un 75 % de los especímenes, como se muestra en la imagen de la figura 6E.

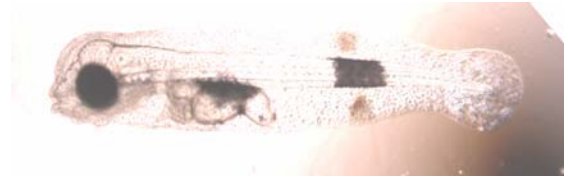
#### 5.2.2.6 HISTOLOGÍA DE APTEROLARVAS

Después de observar los diferentes cortes histológicos de los especímenes en fase de apterolarva, se logro apreciar algunas estructuras bien definidas como son las aletas pectorales, los bastones oculares, el notocordio, el intestino anterior y posterior y los paquetes musculares principalmente. Al observar las imágenes de los especímenes de los cuatro tratamientos diferentes, se tuvo como objetivo ubicar alteraciones histológicas con

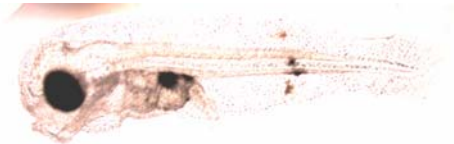
respecto a los especímenes del grupo control. Sin embargo, solo se pudo apreciar en la infección  $1 \times 10^7$  UFC/ml un exceso de melanización en la parte ventral de las apterolarvas, así como un desgaste del epitelio en la región caudal, como puede observarse en las imágenes de la figuras 7A-E. Con respecto a las demás estructuras histológicas, no se encontró ninguna diferencia.



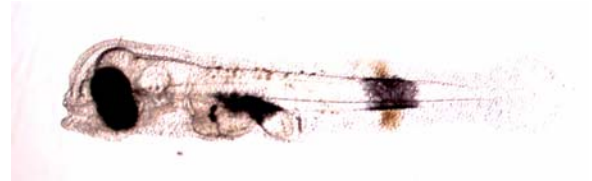
**A**



**B**



**C**



**D**



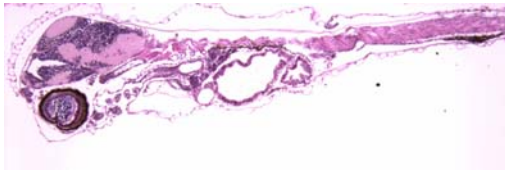
**E**



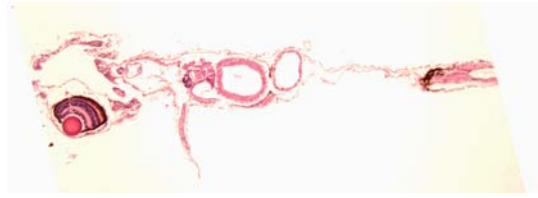
**F**

Figura 6. Morfología externa de la fase apterolarva de *Mycteroperca rosacea* eclosionados de embriones infectados con la cepa Ah-315 de *Aeromonas hydrophila*. A) Fase apterolarva correspondientes al tratamiento control, x40; B) Fase apterolarva infectada con  $1 \times 10^1$  UFC/ml, x40; C) Fase apterolarva infectada con  $1 \times 10^3$  UFC/ml, x40; D) Fase apterolarva infectada con  $1 \times 10^5$  UFC/ml, x40; E) Fase apterolarva infectada con  $1 \times 10^7$  UFC/ml, x40; F) Fase apterolarva con  $1 \times 10^7$  UFC/ml, x40.





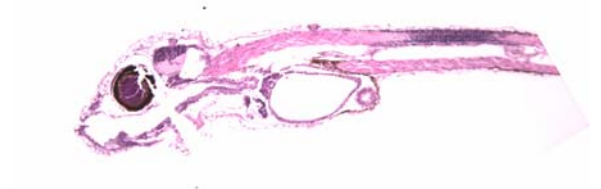
**A**



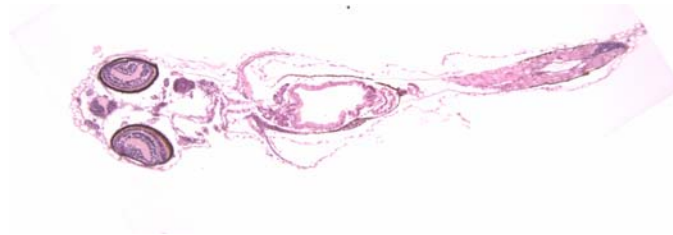
**B**



**C**



**D**



**E**

Figura 7. Cortes histológicos de la fase apterolarva de *Mycteroperca rosacea* obtenidas de embriones libres infectados con la cepa Ah-315 de *Aeromonas hydrophila*. A) Fase apterolarva control, técnica HE, x1000; B) Fase apterolarva infectada con  $1 \times 10^1$  UFC/ml, técnica HE, x1000; C) Fase apterolarva infectada con  $1 \times 10^3$  UFC/ml, técnica HE, x1000; D) Fase apterolarva infectada con  $1 \times 10^5$  UFC/ml, técnica HE, x1000; Larva fase apterolarva infectada con  $1 \times 10^7$  UFC/ml, técnica HE, x1000.

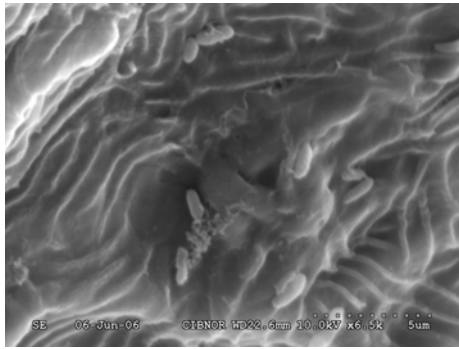
#### 5.2.2.7 ULTRAESTRUCTURA DE APTEROLARVAS

Se tomaron imágenes por MEB de los especímenes correspondientes a la fase de apterolarva de cada uno de los tratamientos (Figs. 8A-E). En estas imágenes se logró apreciar la ultraestructura del epitelio de las apterolarvas, así como los mecanorreceptores. Examinando las imágenes obtenidas, en las larvas control se observaron escasas bacterias y ninguna lesión aparente sobre el epitelio (Fig. 8A). En los especímenes de los tratamientos con las diferentes concentraciones bacterianas de la cepa Ah-315 de *Aeromonas hydrophila*, se pudo apreciar más cantidad de bacterias sobre el epitelio de las apterolarvas, sobre todo en las que estaban expuestas a las dos concentraciones mayores (Figs. 8D y 8E). Por otra parte, también se observó la presencia de mucopolisacáridos, así como de algunas zonas de necrosis en el epitelio de las larvas que estuvieron en contacto con la mayor concentración de bacterias ( $1 \times 10^7$  UFC/ml)

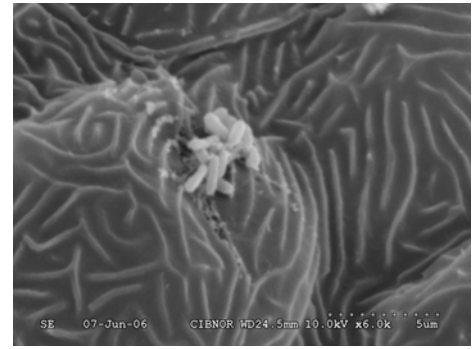
#### 5.2.3 PERIODO JUVENIL

##### 5.2.3.1 ESTABILIDAD DEL SISTEMA DE CIRCULACIÓN CERRADA

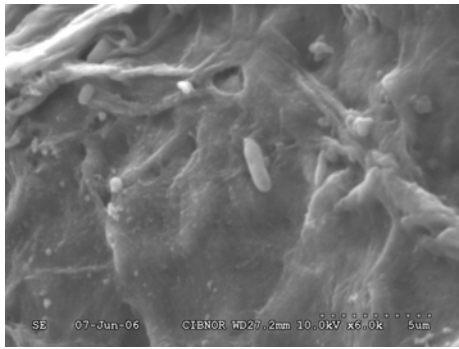
De acuerdo a los valores presentados en la tabla VIII, los parámetros fisicoquímicos se mantuvieron estables durante todo el tiempo que duró el bioensayo con juveniles, ya que la temperatura promedio de los tanques varió de 26.73 a 26.98 °C, asimismo la concentración promedio del oxígeno estuvo entre 5.68 a 5.91 mg/litro, mientras que el valor promedio de la salinidad estuvo de 30.04 a 30.08.



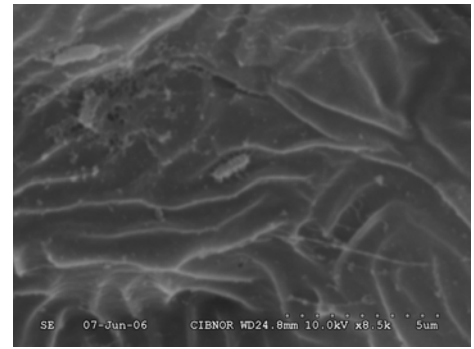
**A**



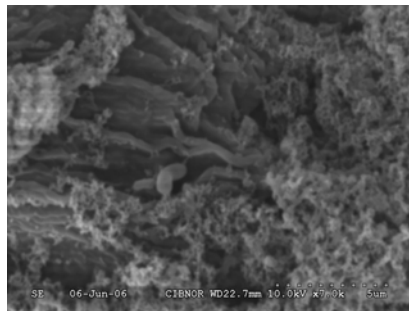
**B**



**C**



**D**



**E**

Figura 8. Micrografías de MEB de la epidermis de apterolarvas de *Mycteroperca rosacea* de tratamiento control e infectados con la cepa Ah-315 de *Aeromonas hydrophila*. A) Fase apterolarva sometida a tratamiento control, se observan pocas bacterias en forma de bastón sobre la epidermis; B) Fase apterolarva infectada con  $1 \times 10^1$  UFC/ml, se observan algunas bacterias en forma de bastón entre las microprotuberancias de la epidermis; C) Fase apterolarva infectada con  $1 \times 10^3$  UFC/ml, se observan bacterias en forma de bastón alrededor de una célula del cloro de la epidermis; D) Fase apterolarva infectada con  $1 \times 10^5$  UFC/ml, se observa un grupo de bacterias en forma de bastón en la unión de las células peridérmicas; E) Fase apterolarva infectada con  $1 \times 10^7$  UFC/ml, donde se observan bacterias sobre la superficie de la epidermis y regiones necrosadas.

Tabla VIII. Valores promedio de parámetros fisicoquímicos durante el bioensayo con juveniles de *Mycteroperca rosacea*. d.s.: desviación estándar.

<b>Tanque</b>	<b>Temperatura promedio ( °C)</b>	<b>d.s.</b>	<b>Oxígeno promedio (mg/l)</b>	<b>d.s.</b>	<b>Salinidad promedio (ppm)</b>	<b>d.s.</b>
1	26.81	0.28	5.91	0.37	30.07	0.20
2	26.72	0.32	5.87	0.23	30.06	0.20
3	26.98	0.21	5.76	0.17	30.04	0.19
4	26.73	0.31	5.75	0.13	30.08	0.20
5	26.90	0.26	5.68	0.14	30.04	0.19
6	26.97	0.23	5.77	0.28	30.10	0.20

### 5.2.3.2 INFECCIÓN CON *Aeromonas hydrophila*

#### 5.2.3.2.1 COMPORTAMIENTO

El patrón de comportamiento de los peces después de inocularles las diferentes concentraciones bacterianas, fue diferente con respecto a los controles. En los juveniles inoculados con las mas altas concentraciones ( $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  UFC/ml) se observo que al transcurrir los días, su nado se torno lento y en ocasiones de lado, además permanecían mas tiempo en el fondo que en la superficie y al final se mostraron inapetentes. Mientras que los juveniles de los dos grupos control, se observaron en general más activos y siempre aceptaban el alimento.

#### 5.2.3.2.2 SIGNOS

Al finalizar el experimento, dos de los peces inoculados con las más altas concentraciones de la bacteria ( $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  UFC/ml), presentaron inflamación en la parte ventral y lesiones en la piel como puede observarse en las figuras 9A y 9B. Estas lesiones se presentaron en forma de ulcera de en el sitio de la inoculación y a un lado de la boca.

Así también, después de llevar a cabo la disección, se observo que los juveniles tenían inflamado el hígado, bazo e intestino y había presencia de líquido (ascitis). En el caso del hígado también se observaron ulceraciones.



Figura 9. Peces juveniles de *Mycteroperca rosacea* inoculados con la concentración  $1 \times 10^8$  UFC/ml de la cepa Ah-315. A) Lesión en el lugar de la inoculación; B) Lesión a un lado de la boca y del ojo.

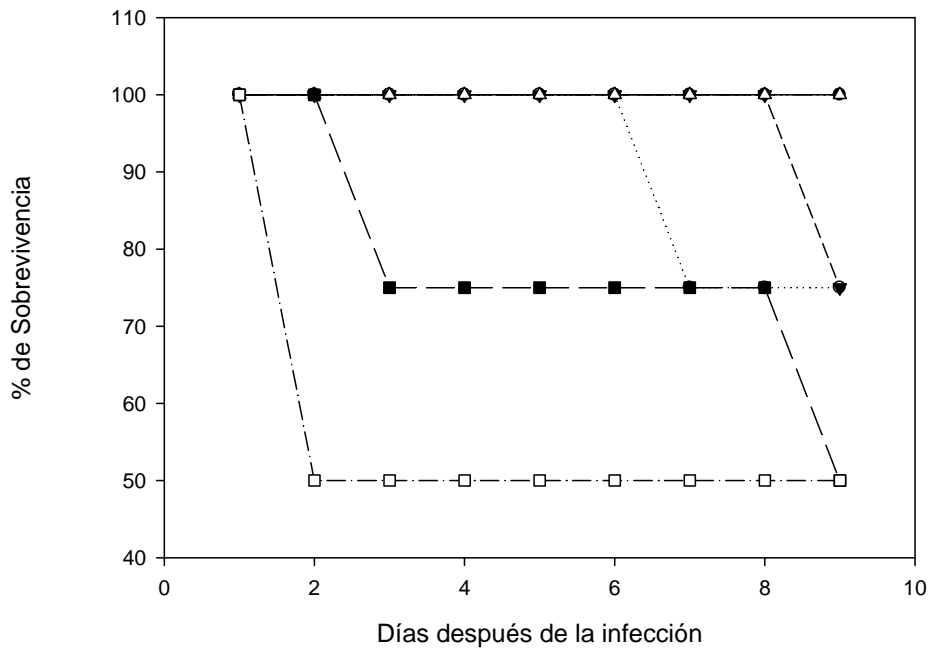


Figura 10. Porcentaje de supervivencia en juveniles de *Mycteroperca rosacea* durante el bioensayo.

#### 5.2.3.2.3 PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA Y CONCENTRACIÓN LETAL AL 50% (LC<sub>50</sub>)

Como se puede apreciar en la figura 10, se obtuvo un 100% de sobrevivencia de los juveniles de los dos grupos control y de la infección  $1 \times 10^6$  contra 75% de los peces correspondientes a la infección  $1 \times 10^5$  y del 50% para  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$ .

Con respecto a la concentración letal media, no fue posible calcularla, porque se obtuvo una pendiente cercana a cero con la transformación de Probit.

#### 5.2.3.2.4 PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

Los resultados de los parámetros hematológicos de los peces juveniles sobrevivientes al final del bioensayo, se observan en la tabla IX.

Con respecto a la concentración de hemoglobina, no hay diferencia significativa en la concentración de hemoglobina de los juveniles infectados con respecto con los controles.

Por otra parte el número de leucocitos tampoco muestra una diferencia significativa.

En el caso de la formula diferencial, se logro apreciar cuatro tipo de leucocitos los cuales a continuación se describen.

- a) Linfocitos: células con poco citoplasma, donde el núcleo ocupa casi toda la célula y que se tiñe intensamente de azul, se observan pequeños y grandes.
- b) Monocitos: Células grandes y de núcleo más pequeño y muy teñido.
- c) Neutrofilos: Núcleo en forma bilobulada
- d) Granulocitos: Células con muchos gránulos que impiden observar el núcleo

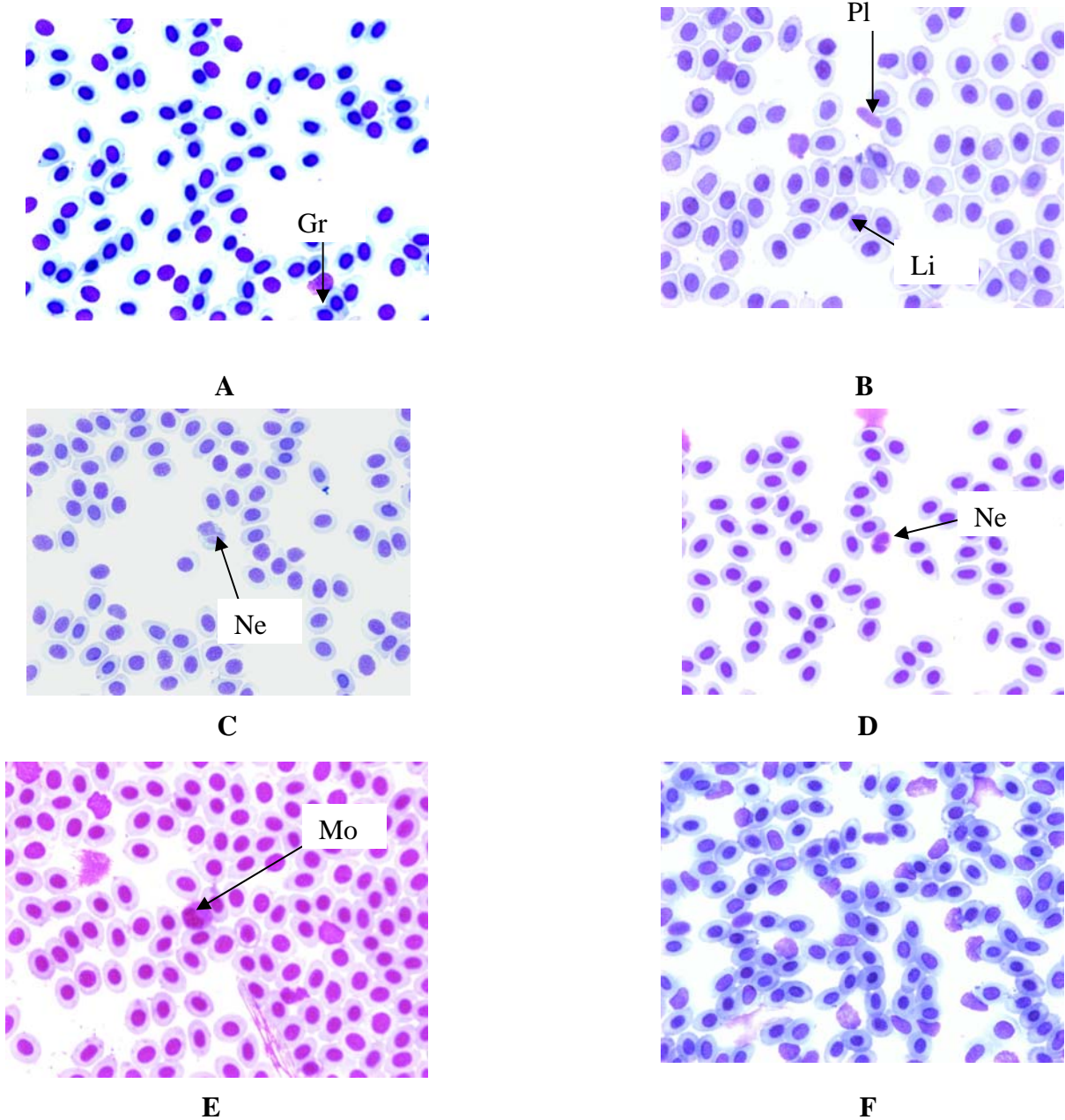


Figura 11. Frotis de sangre periférica de juveniles de *Mycteroperca rosacea* experimentalmente con la cepa Ah-315 de *Aeromonas hydrophila*. Tinción Giemsa, x1000. A) Control, eritrocitos y granulocito; B) Control, plaqueta, linfocito y eritrocitos maduros y en degeneración; C) Control, eritrocitos y neutrofilo segmentado; D) Infección  $1 \times 10^6$  UFC/ml, eritrocitos y neutrofilo segmentado; E) Infección  $1 \times 10^7$  UFC/ml, eritrocitos y monocito; F) Infección  $1 \times 10^7$  UFC/ml, fagocitosis de eritrocitos. Gr, granulocitos; Li, linfocitos; Mo, monocito; Ne, neutrofilos; Pl, plaquetas.



Al analizar las diferentes formulas leucocitarias de los peces sobrevivientes, al finalizar el experimento, solo se observa que en el tratamiento con la concentración bacteriana de mayor concentración se tuvo un incremento en el porcentaje de monocitos, así como un menor porcentaje en el numero de linfocitos con respecto a los controles. Por otra parte, no se logro observar la presencia de granulocitos en el caso de los controles, a diferencia de los peces infectados aunque en los juveniles tratados con la concentración  $1 \times 10^7$  tampoco se observaron.

Tabla IX. Resultados de hemoglobina (Hb), leucocitos totales y cuenta diferencial de leucocitos en juveniles al finalizar el bioensayo.

Tratamiento	Hb (g/dl)	Leucocitos/mm	%Linfocitos	%Monocitos	%Neutrofilos	% Granulocitos
<b>Control 1</b>	3.74 +/- 0.64	2716 +/- 378.5	48 +/- 19.2	26 +/- 3.4	26 +/- 10.3	0
<b>Control 2</b>	1.84 +/- 1.56	6300 +/- 0	52 +/- 11.9	33 +/- 9.9	15 +/- 1.4	0
<b><math>1 \times 10^5</math></b>	2.91 +/- 1.55	1850 +/- 848.5	42 +/- 11.8	24.3 +/- 6.0	14.3 +/- 3.5	19.3 +/- 8.5
<b><math>1 \times 10^6</math></b>	4.89 +/- 1.18	6050 +/- 3126	47.7 +/- 6.3	22 +/- 4.3	31 +/- 14	1.5 +/- 0.4
<b><math>1 \times 10^7</math></b>	3.08 +/- 0.39	5950 +/- 5020	48 +/- 11.3	18 +/- 2.8	34 +/- 8.4	0
<b><math>1 \times 10^8</math></b>	3.44 +/- 0.94	3868 +/- 1086	26.5 +/-	42 +/- 17	18.5 +/- 6.4	13 +/- 3.9

### 5.2.3.3 REAISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LA BACTERIA

Las cepas recuperadas como cultivos puros dieron positivas las pruebas de catalasa y oxidasa, además de que se observaron como cocobacilos Gram negativos en el frotis Gram, por tal motivo se consideraron presuntivas del género *Aeromonas*. En total se obtuvieron 16 cepas con estas características a partir de los órganos de los peces inoculados con las concentraciones bacterianas  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  UFC/ml, tal y como se muestra en la tabla 9. En

los cultivos de los órganos de los peces control no se aislaron colonias bacterianas ni presuntivas del género *Aeromonas* ni de ninguna otra.

Tabla X. Cepas reaisladas de riñón, hígado e intestino de los juveniles de cabrilla sardinera.

Tanque	Inóculo	Pez	Órgano	Reaislamiento
2	$1 \times 10^8$	1	riñón	+
			hígado	+
			intestino	+
		2	riñón	+
			hígado	+
			intestino	+
		3	riñón	+
			hígado	+
			intestino	+
		4	riñón	-
			hígado	+
			intestino	-
6	$1 \times 10^7$	1	riñón	+
			hígado	+
			intestino	+
		2	riñón	+
			hígado	+
			intestino	+

#### 5.2.3.3.1 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

Todas las cepas reaisladas fueron identificadas bioquímicamente como *Aeromonas hydrophila*, de acuerdo a los resultados de las pruebas bioquímicas como se muestra en la

Tabla XI. Características fenotípicas de la cepa Ah-315 *Aeromonas hydrophila* reaislada de los órganos de los peces infectados.

	Ah-315 <i>Aeromonas hydrophila</i>
Oxidasa	+
Catalasa	+
Tinción de Gram	-
Gas de glucosa	+
Descarboxilación de:	
Lisina	-
Ornitina	-
Producción de:	
Indol	+
H <sub>2</sub> S de tiosulfato	-
Indoxil-beta-D-glucósido	+
Hidrólisis de:	
Esculina	+
Urea	-
Orto-nitrofenil-beta-D-galactopiranosida	-
Ácido de:	
Arabinosa	-
Lactosa	-
Sacarosa	+
Inositol	-
Manitol	+
Rafinosa	-
Adonitol	-
Ramnosa	+
Sorbitol	-
Glucosa, lactosa, maltosa, manitol y xilosa	+
Utilización de:	
Acetato	-
Arginina	+
Citrato de Simmons	-
Tryptófano	-
Maltosa	+
Xilosa	-
Resistencia a:	
Polimixina	-
p-coumarico	+
dp300 (2,4,4Tricloro,2-hidroxi-difenileter)	+

tabla XI. Sin embargo la cepa aislada del hígado del juvenil 3 del tratamiento  $1 \times 10^8$  UFC/ml, a pesar de ser identificada como *Aeromonas hydrophila* solo fue reportada por el equipo Vitec, con una pureza del 75%, a diferencia de las demás cepas las cuales fueron reportadas con un porcentaje arriba del 95 % .

#### 5.2.3.3.2 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

De las 16 cepas aisladas, 15 fueron identificadas como *Aeromonas hydrophila*, de acuerdo a la amplificación del ADN por medio de la técnica de PCR, como se muestra en la figura 12. La cepa que no fue posible lograr la amplificación de su ADN con los cebadores utilizados, fue la cepa aislada del hígado del juvenil 3 del tratamiento  $1 \times 10^8$  UFC/ml.

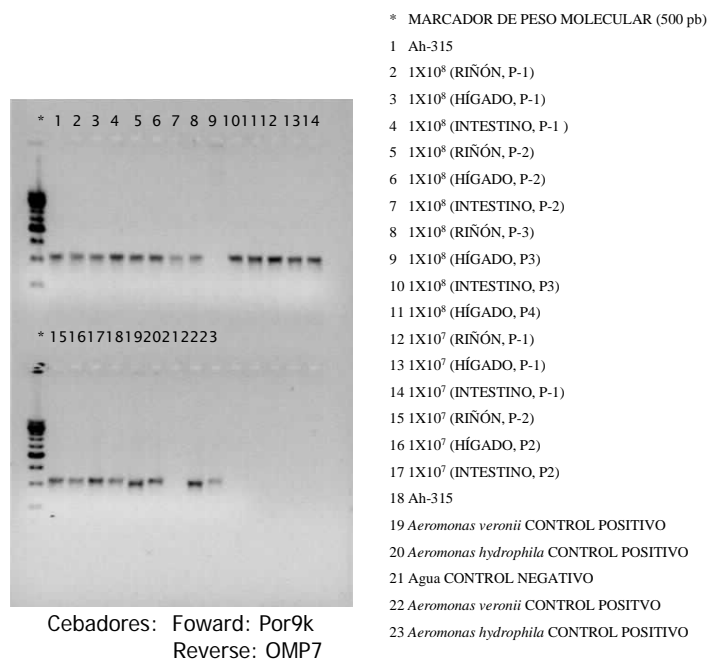
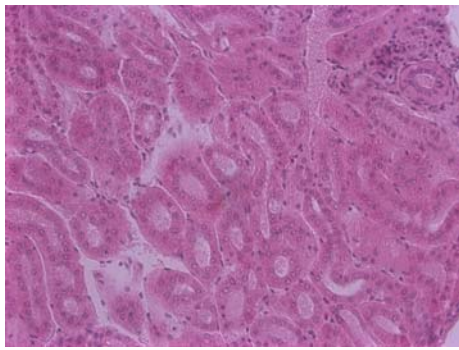


Figura 12. Amplificación de ADN con los cebadores Fw: MR y Re: AV7, donde se observa el número aproximado de pares de bases correspondiente a *Aeromonas veroni* (A186) y *A. hydrophila* (Ah-315), así como de las cepas reaisladas de los órganos infectados.

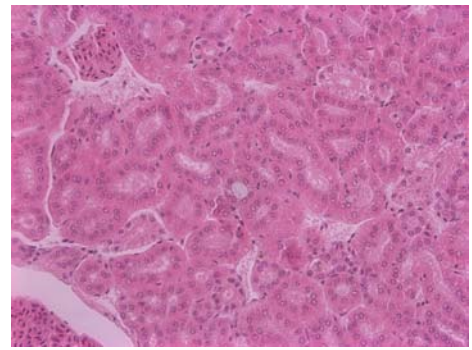
### 5.2.3.3.3 DAÑO HISTOPATOLÓGICO

#### 5.2.3.3.3.1 RIÑÓN

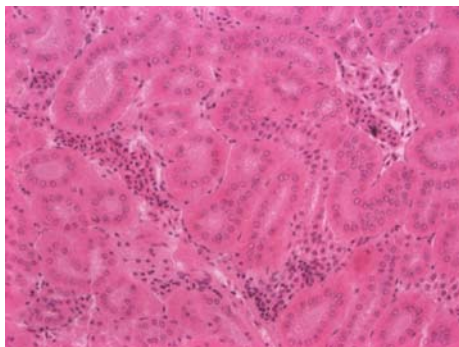
Las alteraciones histológicas que se observaron en los cortes histológicos del riñón de los juveniles infectados, correspondieron principalmente a la región posterior del riñón, en los cuales se apreció infiltración mononuclear y mixto en los espacios íntertubulares de los mesonefros (Fig. 13C). Esta situación fue evidente en el riñón de un 66.6% de los juveniles inoculados a partir de la concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/ml. Así también, se pudo apreciar hiperplasia de la cápsula de Bowman en un 33% de los juveniles inoculados con la concentración  $1 \times 10^7$  UFC/ml (Fig. 13E). Por otra parte se observó necrosis del tejido



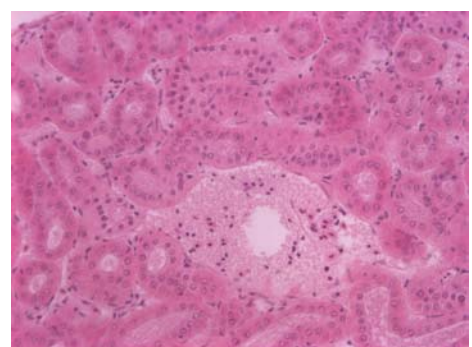
**A**



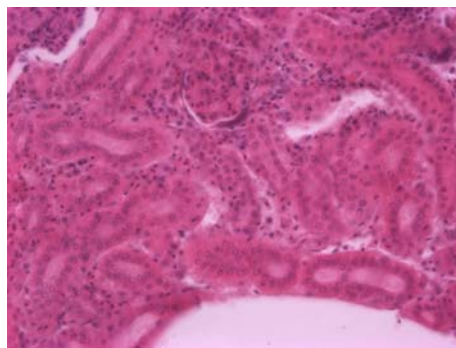
**B**



**C**



**D**



**E**

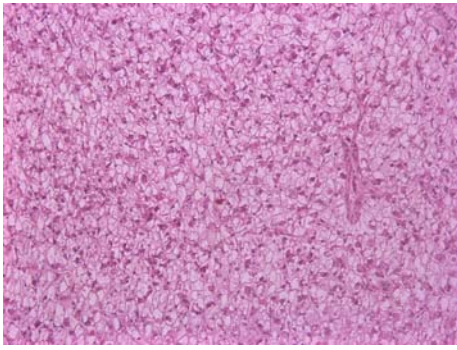
Figura 13. Secciones de cortes histológicos del riñón de juveniles de *Mycteroperca rosacea* infectados con la cepa Ah-315 de *Aeromonas hydrophila*. A) tejido control no infectado, donde se observa parenquima normal; B) tejido infectado con  $1 \times 10^5$  UFC/ml, se observa parenquima sin alteraciones y glomerulo normal; C) tejido infectado con  $1 \times 10^6$  UFC/ml, se observa infiltrado mononuclear; D) tejido infectado con  $1 \times 10^6$  UFC/ml, se observa un foco necrótico en la región intertubular; E) tejido infectado con  $1 \times 10^7$  UFC/ml, se observa hiperplasia de la cápsula de Bowman. Técnica H y E, x400.

linfoide y de los mesonefros (Fig. 13D). Dicha necrosis se encontró en un 33% de los juveniles inoculados con las concentraciones  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^7$  UFC/ml, mientras que en los juveniles inoculados con la concentración  $1 \times 10^8$  UFC/ml esta alteración no se observó (Tabla XII).

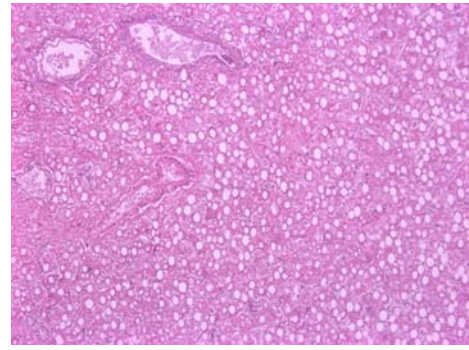
#### 5.2.3.3.3.2 HÍGADO

Los cambios histológicos en el parénquima del hígado, se hicieron evidentes en los cortes histológicos de este órgano en los cuatro grupos de juveniles inoculados con las diferentes concentraciones de la bacteria, aunque la frecuencia con la que se detectaron algunas alteraciones fue diferente entre ellas. Una de estas alteraciones fue la presencia de infiltrado mixto en el parénquima hepático, el cual se detectó en el 50 % de los juveniles inoculados con las suspensiones bacterianas a partir de la concentración  $1 \times 10^6$  UFC/ml y que conforme se incrementó la concentración a  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  UFC/ml, también hubo un incremento en el % de juveniles observados, dando un 75 y 100 % respectivamente.

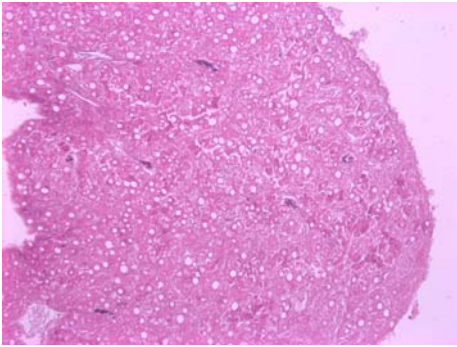
Así también, se observó congestión del tejido hepático, en el 25 % de los juveniles que fueron inoculados desde la concentración bacteriana de  $1 \times 10^5$  UFC/ml, con algunas zonas hemorrágicas que de igual manera fueron más evidentes y con mayor frecuencia al incrementarse la concentración bacteriana, observándose a  $1 \times 10^6$  un 50 % (Fig. 14C) y en las dos concentraciones más altas se observaron en el 100 % de los juveniles. También hubo varias zonas hemorrágicas en un 25 % de los juveniles a partir de la concentración de  $1 \times 10^5$  y zonas necróticas en el 50 % de los juveniles de las dos concentraciones más altas,



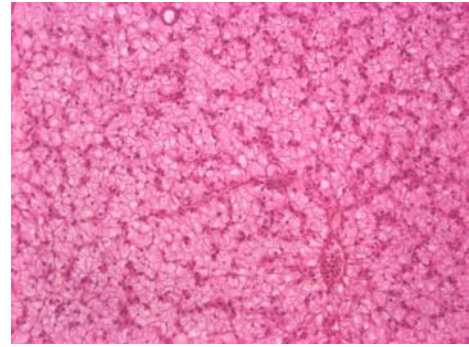
**A**



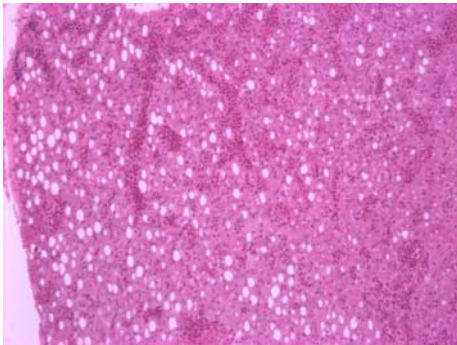
**B**



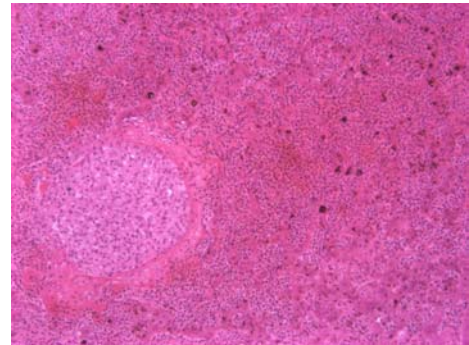
**C**



**D**



**E**



**F**

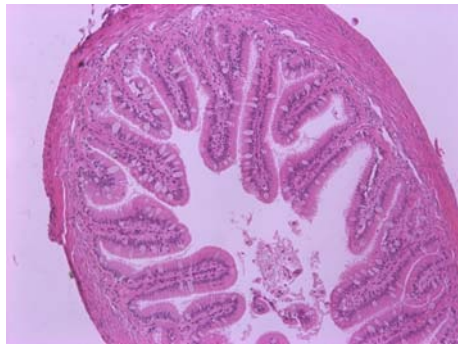
Figura 14. Secciones de cortes histológicos del hígado de juveniles de *Mycteroperca rosacea* infectados con la cepa Ah-315 de *Aeromonas hydrophila*. A) tejido control no infectado, donde se observa parenquima hepático sin alteraciones; B) tejido infectado con  $1 \times 10^5$  UFC/ml, se observa hiperplasia de pared de ductos y vacualización grasa; C) tejido infectado con  $1 \times 10^6$  UFC/ml, se observan microabscesos y ligera congestión; D) tejido infectado con  $1 \times 10^6$  UFC/ml, se observan focos hemorrágicos; E) tejido infectado con  $1 \times 10^7$  UFC/ml, se observan zonas hemorrágicas y vacualización grasa; F) tejido infectado con  $1 \times 10^8$  UFC/ml, se observa necrosis severa del parénquima hepático con presencia de hemosiderosis.



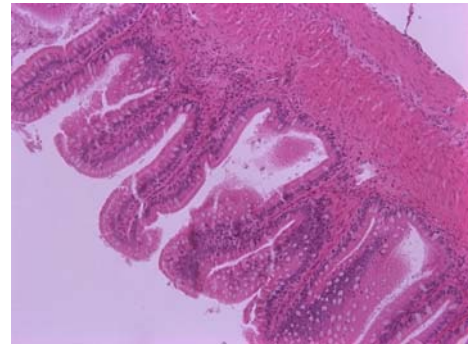
de tipo licuefactivo con presencia de melanomacrofagos y hemosiderina (Fig. 14F). Otras alteraciones observadas fueron: hiperplasia de ductos biliares, algunos microabscesos con presencia de bacterias y vacualización grasa (Tabla XII).

#### 5.2.3.3.3 INTESTINO

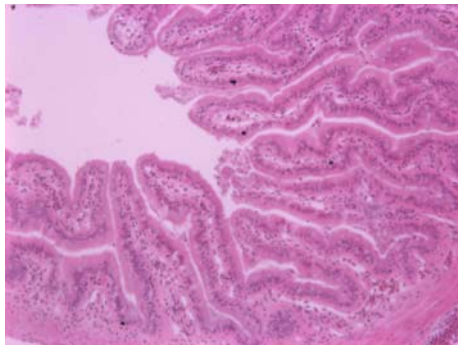
Solo se observaron tres alteraciones histológicas en este órgano, las cuales fueron: infiltrado mononuclear en la lámina propia, lisis del epitelio y atrofia de vellosidades. Estos cambios histológicos únicamente se pudieron apreciar en los cortes histológicos del intestino de los dos grupos de juveniles inoculados con las dos concentraciones mayores de la bacteria ( $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  UFC/ml) (Figs. 15C-E), aunque fue inconsistente, ya que en la concentración de  $1 \times 10^7$  hubo en un 75 % de los juveniles, mientras que en la concentración mas alta bajo al 50 % (Tabla XII).



**A**



**B**



**C**



**D**

Figura 15. Secciones de cortes histológicos del intestino anterior de juveniles de *Mycteroperca rosacea* infectados con la cepa Ah-315 de *Aeromonas hydrophila*. A) corte transversal de tejido control no infectado, donde se observa el epitelio de la mucosa intestinal, lamina propia y la muscular; B) corte longitudinal de tejido control no infectado; C) sección transversal del tejido infectado con  $1 \times 10^7$  UFC/ml, se observa atrofia de microvellosidades y lisis del epitelio; D) tejido infectado con  $1 \times 10^8$  UFC/ml, se observa atrofia de microvellosidades, lisis del epitelio e infiltrado mononuclear en la lámina propia.

Tabla XII. Frecuencia de la patología por grupo de juveniles de *Mycteroperca rosacea*, correspondientes a los tratamientos control y a los infectados con la cepa Ah-315 de *Aeromonas hydrophila*.

Órgano	Cambios histopatológicos	Control 1	Control 2	Ah-315 $1 \times 10^5$	Ah-315 $1 \times 10^6$	Ah-315 $1 \times 10^7$	Ah-315 $1 \times 10^8$
<b>Riñón</b>	Infiltrado mononuclear	0	0	0	100	66.6	50
	Infiltrado mixto	0	0	0	33.3	66.6	50
	Hipertrofia de la cápsula de Bowman	0	0	0	0	33.3	0
	Necrosis	0	0	0	33.3	33.3	0
<b>Hígado</b>	Infiltrado mixto	0	0	0	50	75	100
	Congestión moderada	0	0	25	50	100	100
	Hiperplasia de ductos biliares	0	0	25	25	50	75
	Microabcesos, bacterias	0	0	25	25	50	100
	Vacualización grasa	0	0	25	50	75	50
	Zonas hemorrágicas	0	0	25	50	75	50
	Necrosis	0	0	0	0	50	50
<b>Intestino</b>	Infiltrado mononuclear en la membrana basal	0	0	0	0	75	50
	Lisis del epitelio	0	0	0	0	75	50
	Atrofia de vellosidades	0	0	0	0	75	50

## **6. DISCUSIÓN**

La presencia de enfermedades bacterianas en las fases iniciales de vida, es uno de los principales problemas a los que se enfrenta la industria de la piscicultura marina, ya que una alteración en el sistema de cultivo puede ocasionar la proliferación de bacterias patógenas oportunistas que pueden afectar a los organismos de cultivo, dado que estos aun no tienen bien desarrollado su sistema de defensa y debido a que los brotes bacterianos se presentan cuando los peces son sometidos a condiciones de estrés, así como cuando están hacinados o presentan alguna otra enfermedad (Peters, 1988).

Es importante que al presentarse un problema de enfermedad, se logre identificar al agente etiológico para poder establecer medidas profilácticas o correctivas y evitar así en lo futuro posibles pérdidas económicas. La amenaza latente de que se presente una epizootia de origen bacteriano, una vez que el cultivo de peces marinos se haga una actividad intensiva en México, es lo que nos obliga a estudiar la patogenicidad que tendrían cepas de la especie *Aeromonas hydrophila* contra especies que tienen un potencial acuacultural como *Mycteroperca rosacea*, ya que las cepas de esta especie están mas relacionadas con enfermedades emergentes de salud pública (Castro-Escarpulli *et al.*, 2003; Aslani y Alikhani, 2004; Elwitigala *et al.*, 2005; Longa *et al.*, 2005).

### **Identificación de la cepa**

En el presente trabajo, la identificación de la cepa Ah-315 de *Aeromonas hydrophila*, fue comprobada mediante pruebas bioquímicas y por métodos moleculares, lo cual es necesario, ya que existen muchos problemas para identificar las cepas del género *Aeromonas* (Janda, 1991; Janda y Abbot, 1998), a pesar de no haber utilizado el método RFLP-PCR (Borrell *et*

*al.*, 1997; Figueras *et al.*, 2000) en conjunto con el de hibridación DNA-DNA, se tiene la confianza de haber partido para el estudio de un cepa plenamente identificada.

### **Infecciones Experimentales**

El propósito de realizar una infección experimental durante el periodo embrionario, así como en el periodo juvenil, fue probar el efecto de una bacteria potencialmente patógena para el cultivo de peces, en las fases iniciales de vida de *Mycteroperca rosacea*. Esto con el fin de prever una epizootia de origen bacteriano, en el sistema de producción de semilla de esta especie con potencial acuacultural y así poder establecer medidas profilácticas como en el caso de otros peces marinos (Kennedy *et al.*, 1998; Bergh *et al.*, 2001; Eddy y Jones, 2002; Bricknell *et al.*, 2006; Golomazou *et al.*, 2006).

### **Desarrollo embrionario**

En el presente trabajo, la mayor concentración bacteriana probada de la cepa Ah-315 de *Aeromonas hydrophila*, durante el desarrollo embrionario de *Mycteroperca rosacea*, causaron un efecto negativo con altas mortalidades, hasta la fase de embrión libre, ya que en el huevecillo (fase de segmentación del huevo y fase embrión) no hubo un efecto en el porcentaje de eclosión, esto se debió a que no obstante haberse observado en las imágenes de MEB una aparente adhesividad, requisito indispensable para la infección (Kirov y Sanderson, 1996), posiblemente el tiempo que tarda en eclosionar no es suficiente para permitir que las bacterias adheridas produzcan sus enzimas proteolíticas y permitan que actúen sobre el corión el resto de sus factores de virulencia, como son las aerolisinas y hemolisinas (Pemberton *et al.*, 1997). Esto mismo, se observó, con cepas aisladas a partir

de sistemas intensivos de producción de *Sparus aurata* y *Seriola rivoliana* (Makridis, 2005; Verner-Jeffreys *et al.*, 2006), como con cepas aisladas de la epiflora nativa de *Sardina pilchardus* y de *Polydactylus sexfilis* (Cambaru *et al.*, 2004; Verner-Jeffreys *et al.*, 2006). Mientras que en *Hippoglossus hippoglossus* (= *Psetta maxima*) y *Gadus morhua*, el efecto se noto desde la fase de embrión, ya que en estas dos especies el tiempo de eclosión es mas prolongado y esto permitió la degradación del corión por la actividad de exoenzimas bacterianas (Bergh, 1999). En el caso de la fase de embrión libre, además de la alta mortalidad observada con la máxima concentración bacteriana probada ( $1 \times 10^7$  UFC), en las imágenes de la morfología externa se observo en las apterolarvas una erosión en la aleta caudal y una deformación del notocordio, posiblemente provocado por la acción de los productos extracelulares de las bacterias, daño semejante también fue señalado para *Hippoglossus hippoglossus* (Bergh y Jeffreys, 2003).

### **Periodo juvenil**

De acuerdo a los valores promedio obtenidos en los parámetros fisicoquímicos del sistema, en el cual se mantuvieron los juveniles, los valores de temperatura están dentro de los valores que permiten el mejor crecimiento de la especie y en su valor óptimo en el caso de la salinidad (Gracia-López *et al.*, 2004), mientras que los valores del oxígeno, están dentro del límite recomendado por Tucker (1998) para peces marinos en general. Por lo tanto, existe evidencia para asegurar que las condiciones de manutención, no provocaron ningún incremento del estrés, por lo que no afectaron los resultados de los retos bacterianos realizados.

Con respecto a los resultados de la mortalidad acumulada en el periodo juvenil, el efecto de *Aeromonas hydrophila* sobre *Mycteroperca rosacea* inoculada por vía intraperitoneal a la concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/ml, provoco una septicemia aguda, ya que a las 24 horas se presento una mortalidad del 50%, algo similar a lo ocurrido cuando se inocularon intraperitonealmente cepas de *A. hydrophila* en juveniles de *Anguilla anguilla*, y *Chana punctatus* (Esteve *et al.* 1993; Yesmin *et al.*, 2004) e inclusive cuando se inocularon intramuscularmente cepas de *A. hydrophila* virulentas a concentraciones bajas ( $1 \times 10^4$  UFC/ml) a juveniles de *Clarias gariepinus*, también se provoco septicemia aguda (Angka, 1995). La mortalidad que provoca la inoculación de cepas de *Aeromonas hydrophila*, también puede variar en función de la susceptibilidad de las diferentes poblaciones de las especies de peces, como ocurrió en *Labeo rohita*, ya que se presento una mortalidad del 0 al 100% (Sahoo *et al.*, 2004).

En el presente trabajo, las alteraciones histopatológicas que se presentaron, son un reflejo de la respuesta inmune inespecífica (Ferguson, 1989), que actúa como una segunda línea de defensa cuando se da un proceso infeccioso y se caracterizo en las concentraciones mas bajas como una respuesta inflamatoria y conforme se incrementaron las concentraciones se presento un proceso necrótico, siendo estos cambios evidentes y de mayor a menor grado en hígado, riñón e intestino. Este tipo de lesiones internas, son muy semejantes a las manifestadas en *Micropterus salmoides* y en *Mugil cephalus* cuando se infectaron experimentalmente con cepas de *Aeromonas hydrophila* (Huizinga *et al.*, 1979; Soliman *et al.*, 1989), en el caso de *Clarias batrachus* el daño provocado fue mas agudo, ya que hubo necrosis y hemorragia en riñón, hígado, páncreas e intestino, daños que fueron provocados

aparentemente por la aerolisina que produce la bacteria (Angka, 1990). Por otro lado, debido a que los signos clínicos internos que provocan las cepas de *Aeromonas hydrophila*, dependen de diversos factores, como son la virulencia del organismo, la resistencia del pez a la infección, la presencia o ausencia de bacteremia o septicemia y a las condiciones del estrés (Swan y White, 1991), al infectar juveniles de *Ictalurus punctatus* con un complejo de *Aeromonas hydrophila*, de acuerdo al daño histopatológico, se les provocaron tres tipos de infecciones, una infección sistémica, una infección cutánea y una infección sistémica pero que no muestran signos de la enfermedad (Grizzle y Kiryu, 1993).

Con respecto a los parámetros hematológicos, en el presente trabajo no se observaron datos consistentes que nos indiquen la presencia de una infección sistémica, dado que no se encontró un valor significativamente menor de la hemoglobina, ni un valor significativamente mayor de los leucocitos, tal como sucedió en *Cyprinus carpio*, al ser infectada experimentalmente con *Aeromonas hydrophila* por vía intraperitoneal a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/ml (Harikrishnan *et al.*, 2003). En otro trabajo con *Oncorhynchus mykiss*, en el que se inoculó la bacteria por la vía intramuscular, también se observó un valor menor de la hemoglobina (Rehulca, 2000) y también hubo una disminución de los glóbulos rojos y el hematocrito, pero estos parámetros no fueron medidos en *Mycteroperca rosacea*, por lo que no hay evidencia del comportamiento de dichos parámetros durante la infección por *Aeromonas hydrophila*.

El incremento en los agregados de melanomacrófagos, la lipofuscina y la hemosiderina en riñón, son parámetros que pueden servir para cuantificar el daño causado por una infección sistémica provocada por *Aeromonas hydrophila*, tal y como lo comprobaron en juveniles de



*Ictalurus punctatus* (Matsche y Grizzle, 1999), sin embargo en *Mycteroperca rosaceae*, solo se pudieron distinguir los melanomacrofagos y la hemosiderina en el hígado de los juveniles infectados con las dos concentraciones mas altas cuando se observo necrosis licuefactiva.

Otro de los parámetros hematológicos que mostraron una tendencia al incremento, aunque no hubo una diferencia significativa, fue el porcentaje de monocitos, diferencia que señalaron Martínez-Díaz y Anguas-Vélez (2002), cuando infectaron a juveniles de *Paralabrax maculatofasciatus* con otra especie de bacteria Gram negativa *Vibrio alginolyticus* a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/ml.

## 7. CONCLUSIONES

1. Se comprobó que el método de sembrado en microplaca, empleado para los estudios de infección bacteriana en el periodo embrionario, fue confiable, ya que permite el seguimiento individual.

2. Durante la infección en la fase de embrión libre, se pudo determinar una  $LC_{50}$  de  $5.37 \times 10^9$  UFC/ml a las 27 horas después de la infección, lo cual indica que la bacteria es poco virulenta.

El principal efecto que provocó la infección de  $1 \times 10^7$  UFC/ml en apterolarvas, consistió en anomalías del desarrollo, así como daños externos en el extremo de la cola.

3. De acuerdo a los resultados obtenidos en la infección experimental durante el periodo juvenil, se comprobó la eficiencia del sistema de circulación cerrada de acuerdo a la estabilidad de los parámetros físicos y químicos. En este mismo periodo, no fue posible determinar la  $LD_{50}$ , debido a que la pendiente es muy cercana a cero, lo cual nos indica que al menos no hay un efecto virulento que se refleje en una alta mortalidad. Se comprobaron dos de los postulados de Koch al recuperar la bacteria de los órganos afectados y lograr su identificación bioquímica y molecular.

4. Los daños producidos a nivel histopatológico, fueron mayores en el tejido hepático, seguido por tejido renal, mientras que a nivel de intestino el daño que se observó es mínimo.

5. La infección que causa las concentraciones de  $1 \times 10^7$  a  $1 \times 10^8$  UFC/ml de la cepa Ah-315 de *Aeromonas hydrophila* inoculadas por la vía intraperitoneal en juveniles de *Mycteroperca rosacea*, corresponde a una septicemia hemorrágica aguda, tanto por los valores de la mortalidad acumulada, como por el daño histopatológico a riñón, hígado e

intestino. Por otra parte, la comprobación del agente etiológico fue confirmado al reaislar la bacteria de los tres órganos estudiados.

6. Se tienen evidencias para que la especie *Mycteroperca rosacea* pueda utilizarse como un modelo experimental para probar retos con *Aeromonas hydrophila*, ya que fue posible reproducir una infección sistémica.

## 8. LITERATURA CITADA

- Abbott, S.L., W.K.W. Cheung, S. Kroske-Bystrom, T. Malekzadeh y J.M. Janda. 1992. Identification of *Aeromonas* strains to the genospecies level in the clinical laboratory. J. Clin. Microbiol. 30: 1262-1266.
- Agius, C. 1985. The melano-macrophage centres of fish: A review. In: Fish Immunology. M.J. Manning y M.F. Tatner (eds.). Academic Press. Londres, pp. 85-106.
- Aggar, W.A., J.D. McCormick y M.J. Gurwith. 1985. Clinical and microbiological features of *Aeromonas hydrophila*-associated diarrhea. J. Clin. Microbiol. 21: 909-913.
- Ali, A. A.M. Carnahan, M. Altwegg, J. Luthy-Hottenstein y S.W. Joseph. 1996. *Aeromonas bestiarum* sp. nov, (formerly genomospecies DNA group 2 *A. hydrophila*), a new species isolated from non-human sources. Med. Microbiol. Lett. 5: 156-165.
- Allen, D.A., B. Austin y R.R. Colwell. 1983. *Aeromonas media*, a new species isolated from river water. Int. J. System. Bacteriol. 33: 599-604.
- Altwegg, M., M.W. Reeves, R. Altwegg-Bissing y D.J. Brenner. 1991. Multilocus enzyme analysis of the genus *Aeromonas* and its use for species identification. Zentralblatt für Bakteriologie 275: 28-45.
- Angka, S.L. 1990. The pathology of the walking catfish *Clarias batrachus* (L.) infected intraperitoneally with *Aeromonas hydrophila*. Asian Fish. Sci. 3: 343-351.
- Angka, S.L., T.J. Lam e Y.M. Sin. 1995. Some virulence characteristics of *Aeromonas hydrophila* in walking catfish (*Clarias gariepinus*). Aquaculture 130: 103-112.
- Ardi, V. 2005. Occurrence of *Aeromonas hydrophila* in Southern California's Coastal Waters and Virulence Factors Associated with Infections. Coastal Environmental Quality Initiative.

- Arteaga Garibay, R. I, M. G. Aguilera-Arreola, A. Navarro Ocaña, Silvia Giono Cerezo, M. Sánchez Mendoza, J. Molina López, C. Eslava Campos, A. Cravioto y G. Castro-Escarpulli. 2006. Serogroups, K1 antigen, and antimicrobial resistance patterns of *Aeromonas* spp. strains isolated from different sources in Mexico. Mem Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 101(2): 157-161.
- Athanassopoulou, F., Th. Prapas y H. Rodger. 1999. Diseases of *Puntazzo puntazzo* Cuvier in marine aquaculture systems in Greece. J. Fish Dis. 22: 215-218.
- Austin, B. y D.A. Austin. 1987. Bacterial fish pathogens: Disease in farmed and wild fish. Ellis Horwood, Chichester, England. 364 pp.
- Austin, B. y C. Adams. 1996. Fish pathogens. In: B. Austin, M. Altwegg, P.J. Gosling y S.W. Joseph (eds.). The genus *Aeromonas*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England, pp. 197-243.
- Balon, E.K. 1981. Additions and amendments to the classification of reproductive styles in fishes. Env. Biol. Fishes 6(3/4): 377-389.
- Balon, E.K. 1984. Reflections on some decisive events in the early life of fishes. Trans. Am. Fish. Soc. 113: 178-185.
- Balon, E.K. 2002. Epigenetic processes, when natura non facit saltum becomes a myth, and alternative ontogenies a mechanism of evolution. Environ. Biol. Fishes 65: 1-35.
- Barker, G.A., S.N. Smith y N.R. Bromage. 1989. The bacterial flora of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and brown trout, *Salmo trutta* L., eggs, and its relationship to developmental success. J. Fish Dis. 12: 281-293.
- Basurco, B. 2004. Introduction to Mediterranean aquaculture. In: P. Alvarez-Pellitero, J.L. Barja, B. Basurco, F. Berthe y A.E. Toranzo (eds.). Results of the survey on

- Mediterranean aquaculture diagnostic laboratories conducted within the framework of the CIHEAM/FAO network on "Technology of Aquaculture in the Mediterranean. CIHEAM/FAO, Zaragoza, Spain, pp. 9-13.
- Bergh, O. 2000. Bacterial pathogens associated with early life stages of marine fish. In: C.R. Bell, M. Brylinski y P. Johnson-Green (eds.). Microbial biosystems: new frontiers. Proc. 8<sup>th</sup>. Int. Symp. Microbiol. Ecol. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, pp. 221-228.
- Bergh, O., H. Hansen y R.E. Taxt. 1992. Experimental infection of eggs and yolk sac larvae of halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. J. Fish Diseases 15: 379-391.
- Bergh, O., F. Nilsen y O.B. Samuelson. 2001. Diseases, prophylaxis and treatment of the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*: a review. Dis. Aquat. Org. 48: 57-74.
- Bernstein, R.M., S.F. Schluter y J.J. Marchalonis. 1998. Immunity. In: The physiology of fishes. D.H. Evans (ed.). 2<sup>a</sup> ed. CRC Press LLC. USA, pp. 215-242.
- Björnsdóttir, B., S. Gudmundsdóttir, S.H. Bamfir, B. Magnadóttir y B.K. Gudmundsdóttir. 2004. Experimental infection of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) by *Moritella viscosa*, vaccination effort and vaccine-induced side-effects. J. Fish Dis. 27: 645-655.
- Bly, J.E., N.W. Miller y L.W. Clem. 1990. A monoclonal antibody specific for neutrophils in normal and stressed channel catfish. Dev. Comp. Immunol. 14: 211-221.
- Bricknell, I.R., J.E. Bron y T.J. Bowden. 2006. Diseases of gadoid fish in cultivation: a review. ICES J. Mar. Sci. 63: 253-266.
- Borrell, N., S.G. Acinas, M.J. Figueras y A.J. Martínez-Murcia. 1997. Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restricción fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes. J. Clinical Microbiol. 35: 1671-1674.

- Campbell, T. y F. Murru. 1990. An introduction to fish hematology. The compendium-Small Animal, 12. pp. 525-533.
- Camus, A.C., R.M. Durborow, W.G. Hemstreet, R.L. Thune y J.P. Hawke. 1998. *Aeromonas* bacterial infections –motile aeromonad septicemia. Southern Regional Aquaculture Center Publication No. 478.
- Carnahan, A.M., G.R. Fanning y S.W. Joseph. 1991a. *Aeromonas jandaei* (formerly genospecies DNA group 9 *A. sobria*), a new sucrose-negative species isolated from clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 29: 560-564.
- Carnahan, A.M., T. Chakraborty, G.R. Fanning, D. Verma, A. Ali, J.M. Janda y S.W. Joseph. 1991b. *Aeromonas trota* sp. nov., an ampicilin-susceptible species isolated from clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 29: 1206-1210.
- Cascón, A., J. Anguita, C. Herranz, M. Sánchez, M. Fernández y G. Naharr. 1996. Identification of *Aeromonas hydrophila* hybridization group 1 by PCR assays. Appl. Environm. Microbiol. 62: 1167-1170.
- Cascón, A, J. Yugueros, A. Temprano, M. Sánchez, C. Hernanz, J.M. Luengo y G. Naharro. 2000. A major secreted elastase is essential for pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*. Infect. Immun. 8: 3233-3241.
- Castro-Escarpulli, G., M.G. Aguilera-Arreola, C.H. Hernández-Rodríguez, R.I. Arteaga-Garibay, A.A. Carmona-Martínez, A. Pérez-Valdespino, S. Giono-Cerezo, M.J. Figueras-Salvat y G. Aparicio Ozores. 2003a. La identificación genética de *Aeromonas*, una realidad y una necesidad para la microbiología diagnóstica. Bioquimia 28(4): 11-18.

- Castro-Escarpulli, G., M.J. Figueras, G. Aguilera-Arreola, L. Soler, E. Fernández-Rendón, G.O. Aparicio, J. Guarro y M.R. Chacón. 2003b. Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *Int. J. Food Microbiol.* 84: 41-49.
- Chakraborty, T., B. Huhle, H. Hof, H. Berghauer y W. Goebel. 1987. Marker exchange mutagenesis of the aerolysin determinant in *Aeromonas hydrophila* demonstrates the role of aerolysin in *A. hydrophila*-associated systemic infections. *Infect. Immun.* 55: 2274-2280.
- Chopra, A.K. y C.W. Houston. 1999. Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. *Microbes. Infect.* 1: 1129-1137.
- Chu, W.H. y C.P. Lu. 2003. Invasion of *Aeromonas hydrophila* in cells involving signal transduction and cytoskeleton. *Acta Microbiol. Sinica* 6: 817-820.
- Chu, W.H. y C.P. Lu. 2005. Role of microfilaments and microtubules in the invasión of EPC cells by *Aeromonas hydrophila*. *J. Vet. Med. B* 52: 180-182.
- Cipriano, R. C. 2001. *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. *Fish Disease Leaflet* 68. 24 pp.
- Colwell, R.R., M.R. MacDonell y D.J. Ley. 1986. Proposal to recognize the family Aeromonadaceae fam. nov. *Int. J. Medical Microbiol.* 26: 19-27.
- Cox, D.I., D.J. Morrison y G.H. Rae. 1986. Report of a new *Aeromonas* species infecting skin lesions of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in sea water. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 6: 100-102.
- Davis, W. A., J. G. Kane y V. F. Garagusi. 1978. Human *Aeromonas* infections: a review of the literature and a case of endocarditis. *Medicine (Baltimore)* 57:267-277.



- Davis, J.F. y S.S. Hayasaka. 1983. Pathogenic bacteria associated with cultured American eels, *Anguilla rostrata* Le Sueur. J. Fish Biol. 23: 557-564.
- Dean, H.M. y R.M. Post. 1967. Fatal infection with *Aeromonas hydrophila* in a patient with acute myelogenous leukaemia. Ann. Intern. Med. 66: 1177-1179.
- Doukas, V., F. Athanassopoulou, E. Karagouni y E. Dotsika. 1998. *Aeromonas hydrophila* infection in cultured sea bass *Dicentrarchus labrax* L. and *Puntazzo puntazzo* Gmelin, 1789 from the Aegean Sea. J. Fish Dis. 21: 317-320.
- Dumontet, S., K. Krovacek, S.V. Svenson, V. Pasquale, S.B. Baloda y G. Figliuolo. 2000. Prevalence and diversity of *Aeromonas* and *Vibrio* spp. in coastal waters of southern Italy. Comp. Immunol., Microbiol. Infect. Dis. 23: 53-72.
- Ellis, A.E. 1988. Ontogeny of the immune system on teleost fish. In: Fish Vaccination. Academic Press. England, pp. 20-31.
- Elwitigala, J.P., D.S. Higgs, S. Namnyak, J.W. White y A. Yaneza. 2005. Septic arthritis due to *Aeromonas hydrophila*: case report and review of the literature. Int. J. Clin. Pract. 59 (Supl. 147): 121-124.
- Esteve, C., E.G. Biosca y C. Amaro. 1993. Virulence of *Aeromonas hydrophila* and some other bacteria isolated from European eels *Anguilla anguilla* reared in fresh water. Dis. Aquat. Org. 16: 15-20.
- Esteve, C., M.C. Gutierrez y A. Ventosa. 1995. *Aeromonas encheleia* sp. nov., isolated from european eels. Int. J. System. Bacterial. 45: 462-466.
- Esteve, C., C. Amaro, E. Garay, Y. Santos y A.E. Toranzo. 1995. Pathogenicity of live bacteria and extracelular products of motile *Aeromonas* isolated from eels. J. Appl. Bacteriol. 78: 555-562.

- Falk-Petersen, I.B. 2005. Comparative organ differentiation during early life stages of marine fish. *Fish Shellfish Immunol.* 19: 397-412.
- Fange, R. 1992. Fish Blood Cells. *In: Hoar, W.S., D.J. Randall y A.P. Farrell (eds.). Fish Physiology Vol. XII Parte B. Acad. Press, Inc USA, pp. 1-50.*
- Ferguson, H.W. 1989. Systemic Pathology of Fish. A text and atlas comparative tissue response in diseases of teleost. Iowa state University Press. Ames., pp. 5-103.
- Fernández, M.C., B.N. Giampaolo, S.B. Ibañez, M.V. Guagliardo, M.M. Esnaola, L. Conca, P. Valdivia, S.M. Stagnaro, C. Chiale y H. Frade. 2000. *Aeromonas hydrophila* and its relation with drinking water indicators of microbiological quality in Argentine. *Genetica* 108: 35-40.
- Figueras, M.J., J. Guarro y A.J. Martínez-Murcia. 200a. Use of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified 16S rRNA gene for the identification of *Aeromonas* spp. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2023-2025.
- Figueras, M.J., L. Soler, M.R. Chacón, J. Guarro y A.J. Martínez-Murcia. 2000b. Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA RFLP analysis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 2069-2073.
- Fiorentini, C., E. Barbieri, L. Falzano, P. Matarrese, W. Baffone, A. Pianetti, M. Katouli, I. Kuhn. 1998. Occurrence, diversity and pathogenicity of mesophilic *Aeromonas* in estuarine waters of the Italian coast of the Adriatic Sea. *J. App. Microbiol.* 85: 501-511.
- Frerichs, G.N. y R.J. Roberts. 1989. The bacteriology of teleosts. *In: R.J. Roberts (ed.). Fish pathology. Bailliere Tindall, London, pp. 289-319.*
- Gavriel, A.A., J.P. Landre y A.J. Lamb. 1998. Incidente of mesophilic *Aeromonas* within a public drinking water supplí in north-east Scotland. *J. App. Microbiol.* 85: 383-392.

- Glorioso, J. C., R. L. Amborski, G. F. Amborski y D. D. Culley, Jr. 1974. Microbiological studies on septicemic bullfrogs (*Rana catesbiana*). Am. J. Vet. Res. 35: 1241-1245.
- Gorden, R.W., T.C. Hazen, G.W. Esch y C.B. Fliermans. 1979. Isolation of *Aeromonas hydrophila* from the American alligator, *Alligator mississippiensis*. J. Wildlife Dis. 15: 239-243.
- Gracia-López, V., J. Rodríguez-Romero y J.M. Pérez-Ramírez. 2004a. Inducción al desove con HCG y desarrollo embrionario y de larvas de cabrilla sardinera, *Mycteroperca rosacea* (Streets, 1877). Ciencias Marinas 30(2): 279-284.
- Gracia-López, V., M. Kiewek-Martínez y M. Maldonado-García. 2004b. Effects of temperatura and salinity on artificially reproduced eggs and larvae of the leopard grouper *Mycteroperca rosacea*. Aquaculture 237: 485-498.
- Gracia-López, V., M. Kiewek-Martínez, M. Maldonado-García, P. Monsalvo-Spencer, G. Portillo-Clark, R. Civera-Cerecedo, M. Linares-Aranda, M. Robles-Mungaray y J.M. Mazón-Suastegui. 2005. Larvae and juvenile production of the leopard grouper, *Mycteroperca rosacea* (Streets, 1877). Aquaculture Res. 36: 110-112.
- Grizzle, J.M. e Y. Kiryu. 1993. Histopathology of gill, liver and pancreas, and serum enzyme levels of Channel Catfish infected with *Aeromonas hydrophila* Complex. J. Aquat. Anim. Health. 5: 36-50.
- Groman, D.B. 1982. Histology of the striped bass. American Fisheries Society, Monograph No. 3. Bethesda Maryland. 116 pp.
- Guzmán-Murillo, M.A., M.L. Merino-Contreras y F. Ascencio. 2000. Interaction between *Aeromonas veronii* and epithelial cells of spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*) in culture. J. App. Microbiol. 88: 897-906.

- Hansen, G.H. y J.A. Olafsen. 1989. Bacterial colonization of cod (*Gadus morhua* L.) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs in marine aquaculture. *Appl. Environm. Microbiol.* 55(6): 1435-1446.
- Harikrishnan, R., M.N. Rani y C. Balasundaram. 2003. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture* 221: 41-50.
- Harf-Monteil, C., A.L. Fleche, P. Riegel, G. Prévost, D. Bermond, P.A.D. Grimont y H. Monteil. 2004. *Aeromonas simiae* sp. nov., isolated from monkey faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 481-485.
- Hazen, T.C., G.W. Esch, A.B. Glassman y J.W. Gibbons. 1978a. Relationship of season, thermal loading and red-sore disease with various hematological parameters in *Micropterus salmoides*. *J. Fish Biol.* 12: 491-498.
- Hazen, T.C., C.B. Fliermans, R.P. Hirsch y G.W. Esch. 1978b. Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 166-168.
- Hickman-Brenner, F.W., G.R. Fanning, M.J. Arduino, D.J. Brenner y J.J. III, Farmer. 1988. *Aeromonas shubertii*, a new mannitol-negative species found in human clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 26: 1561-1564.
- Hickman-Brenner, F.W., K.L. Macdonald, A.G. Steigerwalt, G.R. Fanning, D.J. Brenner y J.J. III, Farmer. 1987. *Aeromonas veronii*, a new ornithine decarboxylase-positive species found in human clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 26: 1561-1564.
- Hine, P.M. (1992) The granulocytes of fish. *Fish Shellfish Immunol.* 2: 79-88.

- Holmes, P., L.M. Niccolls y D.P. Sartory. 1996. The ecology of mesophilic *Aeromonas* in the aquatic environment, pp. 127-150. In: B. Austin, M. Altwegg, P.J. Gosling y S. Joseph. 1996. The genus *Aeromonas*. Chichester, England, Wiley & Sons.
- Howard, S.P., W.J. Garland, M.J. Green y J.T. Buckley. 1987. Nucleotide sequence of the gene for the hole-forming toxin aerolysin of *Aeromonas hydrophila*. J. Bacteriol. 169: 2869-2871.
- Huizinga, H.W., G.W. Esch y T.C. Hazen. 1979. Histopathology of red-sore disease (*Aeromonas hydrophila*) in naturally and experimentally infected largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacepede). J. Fish Dis. 2: 263-277.
- Huys, G., P. Kämpfer, M. Altwegg, I. Kersters, A. Lamb, R. Coopman, J. Luthy-Hottenstein, M. Vancanneyt, P. Jansenn y K. Kersters. 1997. *Aeromonas popoffi* sp. nov., a mesophilic bacterium isolated from drinking water production plants and reservoirs. Int. J. System. Bacteriol. 47: 1165-1171.
- Huys, G., P. Kämpfer, M.J. Albert, I. Kühn, R. Denys y J. Swings. 2003. *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* subsp. nov., isolated from children with diarrhea in Bangladesh, and extended description of *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* (Chester 1901) Stainer 1943 (Approved Lists 1980). Int. J. System. Evol. Microbiol. 52: 705-712.
- Huys, G., M. Pearson, P. Kämpfer, R. Denys, M. Cnockaert, V. Inglis y J. Swings. 2003. *Aeromonas hydrophila* subsp. *ranae* subsp. nov., isolated from septicemic farmed frogs in Thailand. Int. J. System. Evol. Microbiol. 53: 885-891.

- Jack, S.W., P.W. Taylor, M.D. Crosby, J. Freund, J.R. MacMillan y R.M. Durborow. 1992. Summary of bacterial isolates from farm-reared channel catfish (1979-1988). *J. Vet. Diagn. Invest.* 4: 193-195.
- Janda, J.M. 2001. *Aeromonas* and *Plesiomonas*, pp. 1237-1270. In: M. Sussman (ed.), *Molecular medical microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Janda, J.M. y S.L. Abbott. 1998. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clin. Infect. Dis.* 27: 332-344.
- Janda, J.M., S.L. Abbott y J.G. Jr Morris. 1995. *Aeromonas*, *Plesiomonas*, and *Edwardsiella*. In: M.J. Blaser, P.D. Smith, J.I. Ravdin, H.B. Greenberg y R.L. Guerrant (eds.). *Infections of gastrointestinal tract*. Raven Press. New York, 905-917.
- Johnson, P. C., H. L. Dupont, , T. K. Satterwhite y L.V. Wood. 1985. Lack of correlation between known virulence properties of *Aeromonas hydrophila* and enteropathogenicity for humans. *Infect. Immun.* 50: 62-65.
- Kennedy, S.B., J.W. Tucker, Jr., C.L. Neidig, G.K. Vermeer, V.L. Cooper, J.L. Jarrell y D.G. Sennett. 1998. Bacterial management strategies for stock enhancement of warmwater marine fish: A case study with common snook (*Centropomus undecimalis*). *Bull. Mar. Sci.* 62(2): 573-588.
- Kerstens, I., L. Van Vooren, G. Huys, P. Janssen, K. Kersters y W. Verstraete. 1995. Influence of temperature and process technology on the occurrence of *Aeromonas* species and hygienic indicator organisms in drinking water production plants. *Microb. Ecol.* 30: 203-218.

- Keskin, M., M. Keskin y H. Rosenthal. 1994. Pathways of bacterial contamination during egg incubation and larval rearing of turbot, *Scophthalmus maximus*. J. Appl. Ichthyology 10: 1-9.
- Kirov, S.M. y K. Sanderson. 1996. Characterization of a type IV bundle-forming pilus (SFP) from a gastroenteritis-associated strain of *Aeromonas veronii* biovar *sobria*. Microbiol. Pathol. 21: 23-34.
- Kozinska, A. 2007. Dominant pathogenic species of mesophilic aeromonads isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. J. Fish Dis. 30: 293-301.
- Krovacek, K., A. Faris, S.B. Baloda, M. Peterz, T. Lindberg e I. Mansson. 1992. Prevalence and characterization of *Aeromonas* spp. isolated from foods in Uppsala, Sweden. Food Microbiol. 9: 29-36.
- Krovacek, K., V. Pasquale, S.B. Balada, V. Soprano, M. Conte y S. Dumontet. 1994. Comparison of putative virulence factors in *Aeromonas hydrophila* strains isolated from marine environment and human diarrheal cases in Southern Italy. Appl. Environm. Microbiol. 60: 1379-1382.
- Kuijper, E.J., A.G. Steigerwalt, B.S.C.I.M Schoenmakers, M.F. Peeters, H.C. Zanen y D.J. Brenner. 1989. Phenotypic characterization and DNA relatedness in human fecal isolates of *Aeromonas* spp. J. Clin. Microbiol. 27 (1): 132-138.
- Larsen, J.L. y N.J. Jensen. 1977. An *Aeromonas* species implicated in ulcer-disease of the cod (*Gadus morhua*). Nordisk Veterinarmedicin 29: 199-211.
- Legnani, P., E. Leoni, F. Soppelsa y R. Burigo. 1998. The occurrence of *Aeromonas* species in drinking water supplies of an area of the Dolomite mountains, Italy. J. App. Microbiol. 85: 271-276.

- Leong, T.S. 2001. Parasitic and bacterial diseases of grouper and other cultured marine finfishes and their control strategies. *In*: M.G. Bondad-Reantaso, J. Humphrey, S. Kanchanakhan and S. Chinabut (eds.). Report and proceeding of APEC FWG Project 02/2000 "Development of a Regional Research Programme on Grouper Virus Transmission and Vaccine Development, 18-20 October 2000, Bangkok, Thailand. Asia Pacific Economic Coopera-tion (APEC), Aquatic Animal Health Research Institute (AAHRI), Fish Health Section of the Asian Fisheries Society (FHS/AFS) and the Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific (NACA). Bangkok, Thailand, pp. 73-80.
- Lio-Po, G.D., L.J. Albright, y E.M. Leño. 1996. Experiments on Virulence dose and portals of entry for *Aeromonas hydrophila* in walking catfish. *J. Aquat. Anim. Health* 8(4): 340-343.
- Lio-Po, G.D., L.J. Albright, C. Michel y E.M. Leño. 1998. Experimental induction of lesions in snakeheads (*Ophicephalus striatus*) and catfish (*Clarias batrachus*) with *Aeromonas hydrophila*, *Aquaspirillum* sp., *Pseudomonas* sp. and *Streptococcus* sp. *J. Appl. Ichthyol.* 14(1/2): 75-79.
- Longa, A., L. Vizcaya, B. Nieves, L. Bravo, L. Morier, I. Pérez-Schael y L.E. Cabrera. 2005. Factores de virulencia asociados a la enteropatogenicidad en cepas de *Aeromonas* spp. aisladas de niños con diarrea en Mérida, Venezuela. *Rev. Cubana Med. Trop.* 57(2): 85-91.
- Maalej, S., R. Gdoura, S. Dukan, A. Hammami y A. Bouain. 2004. Maintenance of pathogenicity during entry into and resuscitation from viable but nonculturable state in



- Aeromonas hydrophila* exposed to natural seawater at low temperature. J. App. Microbiol. 97: 557-565.
- Macayo-Alvear, J. 2004. Evaluación de la patogenicidad de *Vibrio* spp y *Aeromonas* spp en eleuteroembriones y larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. Tesis de Maestría en Ciencias, CICIMAR-IPN. 76 pp.
- Mano, S.B., J.A. Ordoez y G.D. García de Fernando. 2000. Growth/survival of natural flora and *Aeromonas hydrophila* on refrigerated uncooked pork and turkey packaged in modified atmospheres. Food Microbiol. 17: 657-669.
- Martinetti-Lucchini, G. y M. Altwegg. 1992. rRNA gene restriction patterns as taxonomic tools for the genus *Aeromonas*. Int. J. System. Bacteriol. 42: 384-389.
- Martínez-Murcia, A.J., C. Esteve, E. Garay y M.D. Collins. 1992. *Aeromonas allosaccharophila* sp. nov., a new mesophilic member of the genus *Aeromonas*. FEMS Microbiol. Lett. 91: 199-206.
- Merino-Contreras, 1998. Evaluación de vacunas aplicadas por vía oral en la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner, 1868) Osteichthyes; Serranidae. Tesis de Maestría en Ciencias, UABCS. 119 pp.
- Merino-Contreras, M.L., M.A. Guzmán-Murillo, E. Ruiz-Bustos, M.J. Romero, M.A. Cadena-Roa y F. Ascencio. 2001. Mucosal immune response of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner, 1868) orally immunised with an extracellular lectin of *Aeromonas veronii*. Fish Shellfish Immunol. 11 (2): 115-126.
- Míguez, B., M.P. Combarro, C. Guisande, A.R. Vergara e I. Ribeiro. 2004. Effect of bacterial epiflora on egg hatching of the Atlantic sardine (*Sardina pilchardus*). FEMS Microbiol. Ecol. 50: 111-115.

- Miñana-Galvis, D., M. Farfán, M.C. Fusté y J.G. Lorén. 2004. *Aeromonas molluscorum* sp. nov. isolated from bivalve molluscs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 2073-2078.
- Mittal, K.R., G. Lalonde, D. LeBlanc, G. Olivier y R. Lallier. 1980. *Aeromonas hydrophila* in rainbow trout: relation between virulence and surface characteristics. *Can. J. Microbiol.* 26: 1501-1503.
- Nelson, E.J. y W.C. Ghiorse. 1999. Isolation and identification of *Pseudoalteromonas piscida* strain Cura-d associated with diseased damselfish (Pomacentridae) eggs. *J. Fish Dis.* 22: 253-260.
- Nielsen, M.E., L. Hoi, A.S. Schmidt, D. Qian, T. Shimada, J.Y. Shen y J.L. Larsen. 2001. Is *Aeromonas hydrophila* the dominant motile *Aeromonas* species that causes outbreaks in aquaculture production in the Zhejiang Province of China? *Dis. Aquat. Org.* 46: 23-29.
- Olafsen, J.A. 2001. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture* 200: 223-247.
- Olafsen, J.A. y G.H. Hansen. 1992. Intact antigen uptake in intestinal epithelial cells of marine fish larvae. *J. Fish Biol.* 40: 141-156.
- Padrós, F. y M.D. Furones. 2003. Patología bacteriana en piscicultura. *Actualidad* 34: 13-21.
- Panini, E.B., C.C. Mylonas, S. Zanuy, M. Carrillo, J. Ramos y M.P. Bruce. 2001. Incubation of embryos and larvae of marine fish using microtiter plates. *Aquac. Internat.* 9: 189-195.
- Pasquale, V., S. B. Baloda, S. Dumontet y K. Krovacek. 1994. An outbreak of *Aeromonas hydrophila* infection in turtles (*Pseudemys scripta*). *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1678-1680.

- Pemberton, J.M., S.P. Kidd y R. Schmidt. 1997. Secreted enzymes of *Aeromonas*. FEMS Microbiol. Lett. 152: 1-10.
- Peters, G., M. Faisal, T. Lang e I. Ahmed. 1988. Stress caused by social interactions and its effect on susceptibility to *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout *Salmo gairdneri*. Dis. Aquat. Org. 4: 83-89.
- Piper, R.G., I.B. McElwaine, L.E. Orme, J.P. McCraren, L.P. Fowler y J.R. Leonard. 1982. Fish Hatchery management. U.S. Fish Wildl. Serv., Washington, D.C. 517 pp.
- Pidiyar, V., A. Kasnowski, N.B. Narayan, M. Patole e Y.S. Shouche. 2002. *Aeromonas culicicola* sp nov., from the midgut of *Culex quinquefasciatus*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52: 1723-1728.
- Pitarangsi, C., P. Echeverria, R. Whitmore, C. Tirapat, S. Formal, G.J. Dammin y M. Tingtalapong. 1982. Enteropathogenicity of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides*: prevalence among individuals with and without diarrhea in Thailand. Infect. Immun. 35: 666-673.
- Popoff, M.Y., C. Coynault, M. Kiredjian y M. Lemelin. 1981. Polynucleotide sequence relatedness and among motile *Aeromonas* species. Curr. Microbiol. 5: 109-111.
- Popovic, N.T., E. Teskeredzic, I. Strunjak-Perovic y R. Coz-Rakovac. 2000. *Aeromonas hydrophila* isolated from wild freshwater fish in Croatia. Veterin. Res. Commun. 24: 371-377.
- Post, G. 1987. Textbook of fish health. TFH, Neptune City, New Jersey. 288 pp.
- Qian, D., Y. Chen y J. Shen. 1997. Studies on the pathogen of fish bacterial septicemia in Zhejiang Province during 1989-1992. In: Z. Yinggi, H. Fuyuan, Z. Honggi, C. He, Y. Chaoqi, D. Fuhui y L. Yi (eds.). Biochemical characteristics, virulence and serogroups

- of *Aeromonas hydrophila*. Proceedings of fourth Asian Fisheries Forum. China Ocean Press, Beijing, China, pp. 242-245.
- Rahim, Z., K.M.S. Azis, M.I. Huq y H. Saeed. 1985. Isolation of *Aeromonas hydrophila* from the wounds of five species of brackish water fish of Bangladesh. Bangladesh J. Zool. 13: 37-42.
- Rehulca, J. 2002. *Aeromonas* causes severe skin lesions in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): clinical pathology, haematology and biochemistry. Acta Vet. BRNO 71: 351-360.
- Rigney, M.M., J.W. Zillinsky y M.A. Rouf. 1978. Pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* in red leg disease in frogs. Current Microbiol. 1(3): 175-179.
- Roberts, R.J. 1989. The immunology of Teleost. In: Fish Pathology. Baillière Tindall. London, pp. 135-150.
- Rosales-Velásquez, M.O., R. E. Martínez-Pecero, B. Anguas-Velez, M. Contreras-Olguín y O. Rodríguez-Morales. 1992. Inducción al desove de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner) (Pisces: Serranidae) mantenida en laboratorio. In: *Resúmenes III Congreso Nacional de Ictiología*. Oaxtepec, Mor., México, p. 18.
- Rose, B.E. y A.J.G. Okrend. 1998. Isolation and identification of *Aeromonas* species from meat and poultry products, pp. 1-13. In: Microbiology laboratory guidebook. 3<sup>rd</sup>. edition.
- Rose, J.M., W.C. Houston, H.D. Coppenhaver, D.J. Dixon y A. Kurosky. 1989. Purification and characterization of a cholera toxin cross-reactive cytolytic enterotoxin produced by a human isolate of *Aeromonas hydrophila*. Infect. Immunity 57(4): 1165-1169.

- Saavedra, M.J., M.J. Figueras y A.J. Martínez-Murcia. 2006. Updated phylogeny of the genus *Aeromonas*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 2481-2487.
- Saavedra, M.J., S. Guedes-Novais, A. Alves, P. Rema, M. Tação, A. Correia y A. Martínez-Murcia. 2004. Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in *Aeromonas hydrophila* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Int. Microbiol.* 7: 207-211.
- Santos, Y., A. E. Toranzo, J. L. Barja, T. P. Nieto y T. G. Villa. Virulence properties and enterotoxin production of *Aeromonas* strains isolated from fish. *Infect. Imm.* 56(2): 3285-3293.
- Semel, D.J. y G. Trenholme. 1990. *Aeromonas hydrophila* water associated traumatic wound infections: a review. *J. Trauma* 30: 324-327.
- Schubert, R.H.W. 1974. Genus II. *Aeromonas* Kluyver and Van Niel 1936,. *In*: R.E. Buchanan y N.W. Gibbons (eds.). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8<sup>th</sup> ed. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, pp. 345-348.
- Shao, J-Z, J. Liu y L-X Xiang. 2004. *Aeromonas hydrophila* induces apoptosis in *Carassius auratus* lymphocytes in vitro. *Aquaculture* 229: 11-23.
- Shubert, R.H.W. y M. Hegazi. 1988. *Aeromonas eucrenophila* species nova and *Aeromonas caviae*, a later and illegitimate synonym of *Aeromonas punctata*. *Zentralblatt für Bacterologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten und Hygiene, Abt. 1*, 268: 34-39.
- Skjermo, J. y O. Vadstein. 1999. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture* 177: 333-343.

- Sniesko, S.F. 1957. The genus *Aeromonas* Kluver and Van Neil 1936. In: R.S. Breed, E.G.D. Murray y N.R. Smith (eds.). Bergey's manual of determinative bacteriology. 7<sup>th</sup>. Ed. Williams and Wilkins Co. Baltimore, M.D., pp. 189-193.
- Soliman, M.K, M. El. Easa, M. Faisal, I.M. Abou-Elazm y F.M. Hetrick. 1989. Motile aeromonas infection of striped (grey) mullet *Mugil cephalus*. Antonie Van Leeuwenhoek 56(4): 323-335.
- Stoskopf, M.K. 1993. Immunology. In: Fish Medicine. H. B. Jovanovich (ed.). W.B. Saunders Company. Inc., Philadelphia, USA, 153.
- Tan, E., K.W. Low y W.S.F. Wang. 1998. Internalization of *Aeromonas hydrophila* by fish epithelial cells can be inhibited with a tyrosine kinasa inhibitor. Microbiology 144: 299-307.
- Thune, R.L., L.A. Stanley y K. Cooper. 1993. Pathogenesis of Gram-negative bacterial infections in warm water fish. Annu. Rev. Fish Dis. 3: 37-68.
- Trust, T.J., L.M. Bull, B.R. Currie y J.T. Buckley. 1974. Obligate anaerobic bacteria in the gastrointestinal microflora of the grass carp (*Ctenopharingodon idella*), goldfish (*Carassius auratus*), and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Fish. Res. Board Can. 36: 1174-1179.
- Tucker, J.W. Jr. 1998. Marine fish culture. Kluwer Academic Publishers, Boston. 750 pp.
- Tizard, I. 1992. The phylogeny of the immune system. In: Veterinary Immunology an introduction. H. B. Jovanovich (ed.). W.B. Saunders Company, Inc. USA, 457-469.
- Unuma, T., S. Kondo, H. Tanaka, H. Kagawa, K. Nomura y H. Ohta. Determination of the rates of fertilization, hatching and larval survival in the Japanese eel, *Anguilla japonica*, using tissue cultura microplates. Aquaculture 241: 345-356.

- Verner-Jeffreys, D.W., I. Nakamura y R.J. Shields. 2006. Egg-associated microflora of Pacific threadfin, *Polydactylus sexfilis* and amberjack, *Seriola rivoliana*, eggs. Characterisation and properties. *Aquaculture* 253: 184-196.
- Villamil, L., A. Figueras, R. Aranguren y B. Novoa. 2003. Non-specific immune response of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), experimentally infected with a pathogenic *Vibrio pelagius*. *Journal of Fish Diseases* 26: 321-329.
- Vivekanandhan, G., A.A.M. Hatha y P. Laksshmanaperumalsamy. 2005. Prevalence of *Aeromonas hydrophila* in fish and prawns from the seafood market of Combatore, South India. *Food Microbiol.* 22: 133-137.
- Whali, T., S.E. Burr, D. Pugovkin, O. Mueller y J. Frey. 2005. *Aeromonas sobria*, a causative agent of disease in farmed perch, *Perca fluviatilis*. *J. Fish Dis.* 28: 141-150.
- Yasutake, W.T. y J.H. Wales. 1983. Microscopio anatomy of salmonids: an atlas. Resource Publication 150. Fish and Wildlife Service, U.S. Dep. Interior. Washington, D.C. 189 pp.
- Yavuzcan, Y.H., S. Bekcan, A.C. Karasu Benli y M. Akan. 2005. Some blood parameters in the eel (*Anguilla anguilla*) spontaneously infected with *Aeromonas hydrophila*. *Israel J. Veterin. Med.* 60(3): 91-92.
- Yesmin, S., M.H. Rahman, M.A. Hussain, A.R. Khan, F. Pervin y M.A. Hossain. 2004. *Aeromonas hydrophila* infection in fish of swaps in Bangladesh. *Pakistan J. Biol. Sci.* 7(3): 409-411.