

T
355

84857



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

Estudio de *Vibrio fluvialis* (Lee et al. 1981) y *Vibrio furnissii*
(Brenner et al, 1984) como agentes causales de infecciones en el
pez dorado, *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758).

T E S I S

Que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Biológicas

PRESENTA:

María del Pilar Negrete Redondo

DIRECTOR: Dr. José Luis Arredondo Figueroa

ASESOR: Dra. Marisol López López

ASESOR: Dr. Pedro Ramírez García

Abril 2004

EL JURADO DESIGNADO POR LAS DIVISIONES DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD DE LAS UNIDADES
IZTAPALAPA Y XOCHIMILCO APROBÓ LA TESIS QUE
PRESENTÓ:

María del Pilar Negrete Redondo


TUTOR: DR. JOSÉ LUIS ARREDONDO FIGUEROA


ASESOR: DRA. MARISOL LÓPEZ LÓPEZ


ASESOR: DR. PEDRO RAMÍREZ GARCÍA


SINODAL: DR. TEÓFILO HERRERA SUÁREZ


SINODAL: DRA. THALIA CASTRO BARRERA

“El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana, pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo con el Convenio PFP-20-93”.

Al M. en C. Jorge Manuel Romero Jarero, responsable del laboratorio de Microbiología Marina del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, por todo lo que ha implicado el logro conjunto de esta nueva meta.

Al Dr. José Luis Arredondo Figueroa, responsable de la Planta Experimental Piloto Acuicola de la Universidad Autónoma Metropolitana-Ixtapalapa, por su confianza, apoyo y guía para la realización del presente trabajo de tesis.

A la Dra. Marisol López López y al Dr. Pedro Ramírez García, por haber fungido como Asesores.

Al Dr. Teófilo Herrera Suárez y a la Dra. Thalía Castro Barrera, por haber aceptado y formar parte del jurado.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	4
ANTECEDENTES	37
PLANTEAMIENTO DE PROBLEMAS	42
JUSTIFICACIÓN	43
HIPÓTESIS DE TRABAJO	45
OBJETIVOS	46
MATERIALES Y MÉTODOS	47
Prospección sanitaria de granjas y selección de la zona de muestreo.	47
Toma de muestras.	48
Determinación cuantitativa	48
Selección de ejemplares.	48
Procesamiento de las muestras.	49
Preparación de muestras para conteo con Microscopio de Epifluorescencia.	50
Preparación de muestras para Microscopio Electrónico de Barrido.	50
Determinación cualitativa.	51
Procesamiento de las muestras.	51
Identificación con API-20E y API-20NE y pruebas complementarias.	51
Identificación por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.	52
Determinación de la patogenicidad y $D_{50}L$ de <i>V. fluvialis</i> y <i>V. furnissii</i> .	54
Determinación de la sensibilidad de las cepas de <i>A. hydrophila</i> , <i>V. fluvialis</i> y <i>V. furnissii</i> , a antibióticos.	56
Determinación de presencia de plásmidos-R.	57
Determinación de la relación de la virulencia con la presencia de plásmidos en cepas de <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Vibrio fluvialis</i> y <i>Vibrio furnissii</i> .	58
Determinación de la capacidad de <i>A. hydrophila</i> , <i>V. fluvialis</i> y <i>V. furnissii</i> , para transferir plásmidos por conjugación.	59
RESULTADOS	60
Prospección de las granjas.	60
Determinación cuantitativa.	63
Determinación cualitativa.	67

Determinación de la patogenicidad y D ₅₀ L de <i>V. fluvialis</i> y <i>V. furnissii</i> .	83
Determinación de la sensibilidad a antibióticos y presencia de plásmidos-R.	95
Determinación de la relación de la virulencia con la presencia de plásmidos.	100
Determinación de la capacidad de <i>A. hydrophila</i> , <i>V. fluvialis</i> y <i>V. furnissii</i> , para transferir plásmidos por conjugación.	103
DISCUSIÓN	104
CONCLUSIONES	119
LITERATURA CITADA	121
RELACIÓN DE TABLAS Y FIGURAS	134
Tabla 1 Microorganismos patógenos de organismos acuáticos reportados de 1970 a 1991 en el Biological Abstracts .	12
Tabla 2 Microorganismos patógenos de organismos acuáticos reportados de 1980 a 1990 en el Bacteriological Review.	14
Tabla 3 Organismos acuáticos hospederos de microorganismos patógenos.	16
Tabla 4 Enfermedades causadas por microorganismos patógenos a organismos acuáticos reportados en el Biological Abstracts.	17
Tabla 5 Enfermedades causadas por microorganismos patógenos a organismos acuáticos reportados en el Biological Abstracts	18
Tabla 6 Producción científica en el Área de Sanidad Acuícola(Biological Abstracts).	19
Tabla 7 Producción científica en el Área de Sanidad Acuícola(Bacteriological Review).	19
Tabla 8 Producción Científica por países en el Área de Sanidad Acuícola por periodos de 1920 a 1999 (Biological Abstracts).	21
Tabla 9 Puntos críticos del manejo de granjas acuícolas productoras de pez dorado <i>C. auratus</i> en el Estado de Morelos.	60
Tabla 10 Conteo bacteriológico de muestras de agua de los estanques de cultivo de <i>C. auratus</i> Técnica de conteo en placa.	64
Tabla 11 Conteo bacteriológico de muestras de agua de los estanques donde se cultiva <i>C.auratus</i> . Coliformes fecales y totales.	65
Tabla 12 Conteo bacteriológico de muestras de riñón de <i>C. auratus</i> y del agua de los cultivos.	65
Tabla 13 Conteo de bacteriológico de muestras de alimento balanceado y vivo, administrado en el cultivo de <i>C. auratus</i> . Técnica de conteo total viable	66
Tabla 14 Conteo bacteriológico de muestras de alimento administrado para el cultivo de <i>C. auratus</i> . Técnica de microscopía de epifluorescencia.	67
Tabla 15 Especies de bacterias identificadas de muestras de agua, alimento y pez.	67
Tabla 16 Índice de Jaccard aplicado a las cepas bacterianas aisladas de muestras agua, alimento y peces.	70
Tabla 17 Reacciones bioquímicas de <i>V. furnissii</i> (ATCC 35016), <i>V. fluvialis</i> (ATCC11327) <i>A. hydrophila</i> (ATCC35654) y cepas silvestres aisladas de agua, alimento y peces.	75
Tabla 18 Caracteres bioquímicos para diferenciar a <i>A. hydrophila</i> de <i>Vibrio fluvialis</i> y <i>Vibrio furnissii</i> .	77
Tabla 19. Caracteres bioquímicos específicos para diferenciar <i>V. furnissii</i> , ATCC 35654), <i>V. fluvialis</i> (ATCC11327), <i>A. hydrophila</i> (ATCC35654) y cepas silvestres.	80
Tabla 20 Titulación de inmunoglobulinas: grupo control y experimental 10 ⁴ ufc/mL	84

cultivo de <i>C. auratus</i> . Técnica de microscopía de epifluorescencia.	67
Tabla 15 Especies de bacterias identificadas de muestras de agua, alimento y pez.	67
Tabla 16 Índice de Jaccard aplicado a las cepas bacterianas aisladas de muestras de agua, alimento y peces.	70
Tabla 17 Reacciones bioquímicas de <i>V. furnissii</i> (ATCC 35016), <i>V. fluvialis</i> (ATCC11327) <i>A. hydrophila</i> (ATCC35654) y cepas silvestres aisladas de agua, alimento y peces.	75
Tabla 18 Caracteres bioquímicos para diferenciar a <i>A. hydrophila</i> de <i>Vibrio fluvialis</i> y <i>Vibrio furnissii</i> .	77
Tabla 19. Caracteres bioquímicos específicos para diferenciar <i>V. furnissii</i> , ATCC 35654), <i>V. fluvialis</i> (ATCC11327), <i>A. hydrophila</i> (ATCC35654) y cepas silvestres.	80
Tabla 20 Titulación de inmunoglobulinas: grupo control y experimental 10^4 ufc/mL	84
Tabla 21 Titulación de inmunoglobulinas: grupo control y experimental 10^3 ufc/mL	85
Tabla 22 Lote control de <i>C. auratus</i> , inoculados con solución salina al 8%	86
Tabla 23 Signos y lesiones mostrados por <i>C. auratus</i> inoculados con 10^7 ufc/mL de <i>V. fluvialis</i> .	87
Tabla 24 Signos y lesiones de de <i>C. auratus</i> inoculados con 10^6 ufc/mL de <i>V. fluvialis</i>	87
Tabla 25 Signos y lesiones de <i>C.auratus</i> inoculados con 10^5 ufc/mL de <i>V. fluvialis</i> .	88
Tabla 26 Signos y lesiones de <i>C.auratus</i> inoculados con 10^4 ufc/mL de <i>V. fluvialis</i> .	89
Tabla 27 Signos y lesiones de <i>C.auratus</i> inoculados con 10^3 ufc/mL de <i>V. fluvialis</i> .	90
Tabla 28 Signos y lesiones de <i>C.auratus</i> inoculados con 10^7 ufc/mL de <i>V. furnissii</i> .	91
Tabla 29 Signos y lesiones de <i>C.auratus</i> inoculados con 10^6 ufc/mL de <i>V. furnissii</i> .	91
Tabla 30 Signos y lesiones de <i>C.auratus</i> inoculados con 10^5 ufc/mL de <i>V. furnissii</i> .	92
Tabla 31 Signos y lesiones de <i>C. auratus</i> inoculados con 10^4 ufc/mL de <i>V. furnissii</i> .	93
Tabla 32 Signos y lesiones de <i>C.auratus</i> inoculados con 10^3 ufc/mL de <i>V. furnissii</i> .	93
Tabla 33 Caracterización diagnóstica general de los peces inoculados con diferentes dosis infectivas de <i>V. fluvialis</i> y <i>V. furnissii</i>	95
Tabla 34 Resistencia a antibióticos de cepas bacterianas aisladas de agua, alimento y peces	96
Tabla 35 Pesos moleculares y resistencia de los antibióticos en diferentes cepas bacterianas aisladas de agua, alimento y peces.	97
Tabla 36 Pesos moleculares de plásmidos extraídos de <i>Pseudomonas</i> aisladas de muestras de agua, alimento y peces.	99
Figura 1 Modelo del balance salud-enfermedad en un sistema acuático.	26
Figura 2 Gel de agarosa. Productos de PCR	81
Figura 3 Gel de agarosa. Productos de PCR	82
Figura 4 Electroforesis del agarosa. Presencia de plásmidos.	98
Figura 5 Crecimiento de bacterias en agar sangre	100
Figura 6 Resistencia a antibióticos (Multidiscos Sanofi)	101
Figura 7 Crecimiento comparativo en agar sangre de cepas antes y después del proceso de curación de plásmidos	102.
Figura 8 Electroforesis en gel de agarosa.Comprobación de ausencia de plásmidos	103

RESUMEN

La importación y exportación de gran cantidad de peces de especies exóticas en el mercado internacional, ha provocado también la movilización de la flora bacteriana que portan estos individuos, microorganismos cuya relación etiológica con su hospedero aún es desconocida, misma que al ingresar a granjas acuícolas con condiciones ambientales, sanitarias y de producción diferentes a las nativas, pueden llegar a variar su capacidad infecciosa y provocar graves pérdidas en los cultivos al manifestar su virulencia. El uso desmedido de antibióticos como estrategia de control y prevención de estas infecciones ha generado la presencia de plásmidos-R, atribuyendo resistencia a antibióticos a las bacterias ictiopatógenas, muchas de ellas de riesgo también para el humano. La determinación de factores de patogenicidad como la virulencia, entre otros, se ha relacionado con plásmidos a partir de estudios pioneros en *Vibrio anguillarum*. En granjas acuícolas del estado de Morelos, cuya principal actividad es el cultivo de peces de la especie *Carassius auratus*, se han aislado sistemáticamente bacterias de dudosa identificación como *Aeromonas hydrophila* y *Vibrio fluvialis*; esta última hasta el momento no se ha reconocido como patógena de organismos acuáticos. En el presente estudio después de efectuar la prospección sanitaria en cinco granjas acuícolas del Estado de Morelos, se identificó, con ayuda del API-20E, API-20NE, pruebas bioquímicas complementarias y PCR, además de las bacterias ya mencionadas, también se aisló *Vibrio furnissii*, bacteria que hasta el momento igualmente es desconocida como patógeno de organismos acuáticos. Se estableció $10^{4.5}$ ufc/mL como la D_{50L} de ambas especies de *Vibrio*, igualmente se definió el síndrome dermonecrosis ulcerativa con septicemia aguda como el cuadro clínico provocado por ambas especies, por lo cual se les definió como patógenos sumamente agresivos de alto riesgo para el cultivo de organismos acuáticos, cumpliéndose los cinco postulados de Koch. Se comprobó la necesidad de estas dos especies de un hospedero vivo para poder transmitir la infección. Las tres especies estudiadas fueron portadoras de plásmidos-R con pesos

moleculares de intervalos de 25.7 pb hasta 6.6 pb, con resistencia a los siguientes antibióticos: cefalotina, tetraciclina, nitrofurantoina, ampicilina, carbacilina y kanamicina. Las bacterias estudiadas no presentaron capacidad de transmitir los plásmidos por conjugación a bacterias receptoras de *Escherichia coli*. Después de someter las cepas *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis* y *V. furnissii*, silvestre y de colección, con capacidad de α -hemólisis y con resistencia a antibióticos, al proceso de curación de plásmidos con naranja de acridina, se comprobó la relación de estas características con la presencia de plásmidos, ya que estas bacterias perdieron la capacidad de hemólisis y se volvieron sensibles a los antibióticos utilizados.

ABSTRACT

Import and export of greater amounts of exotic species of fish from international markets such as Singapore, Malaysia, Thailand, Honk Kong and Japan have brought about, as well, the mobilization of the bacterial flora that these microorganisms carry along and whose etiological relation with its host is still unknown. Also, as they enter the aquatic farms with environmental, sanitary and production conditions different from their native conditions, their infecting capacity can vary and cause severe losses in the farming as they manifest their virulence. The unregulated use of antibiotics as control and prevention strategies of these infections has generated the presence of plasmid-R, providing the bacteria with ictiopathogenic risk resistance to antibiotics, many of which are also a risk for humans. The determination of pathogenic factors as virulence, among other, has been related to plasmid from pioneer research in *Vibrio anguillarum*. In aquatic farms in Morelos, whose main activity is the production of fish *Carassius auratus*, bacteria from doubtful identification such as a *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio fluvialis* have been isolated systematically; although this bacteria has not been recognized as pathogen of aquatic organisms to date. In the current research, after making the sanitary prospecting in five aquatic farms in Morelos, besides the already mentioned bacteria, *Vibrio furnissii* was isolated and identified by means of API-20E and API-20NE techniques, complement identification tests and PCR technique, such bacteria is to this time unknown as pathogen of aquatic organisms. $10^{4.5}$ cfu/mL was established as L_{50D} of both *Vibrio* species, likewise, the focal dermomyonecrosis ulcerative acute conceptive syndrome was defined as the clinical diagnostic caused by both species; therefore, they were defined as highly aggressive pathogens of high risk for the cultivation of aquatic organisms, fulfilling the postulates by Koch. The necessity of those two species in lodging in order to transmit the infection was proved. The three species studied contained R-plasmids with molecular weights ranging from 25.7 to 6.6. bp, with resistance to the following antibiotics: cephalothin, tetracycline, nitrofurantoin, ampicillin and kanamycin. No one of the plasmid were able to transfer to

Escherichia coli and no incompatibility group could be determined. After putting through the strains of *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis* and *Vibrio furnissii*, both, wild and collection strain with haemolytic capacity and resistance to antibiotics, to the plasmids curing process with acridine orange, the relationship of the virulence of these strains was proved, it was assumed as the capacity to hemolyse blood, with the presence of plasmid, when obtaining negative growth from the strains while were seeded on blood agar plates and the antibiotics susceptibility test.

INTRODUCCIÓN

La acuicultura en México tradicionalmente ha hecho uso de estrategias de cultivo de organismos vivos para la obtención de proteína de origen animal, para consumo humano, desarrollándose como consecuencia fuentes de trabajo para las poblaciones rurales aledañas por medio de la pesca de subsistencia (Barnabé, 1991). Sin embargo, durante la última década estas comunidades rurales han cambiado al cultivo de especies exóticas, improvisando, en el mejor de los casos, estanques de concreto o bien implementándolos excavando un hoyo en el suelo. Una de éstas especies exóticas es el pez *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758), mejor conocido como pez dorado, de origen oriental, que por su belleza se ha constituido en una de las especies de mayor demanda comercial tanto en Europa como en México (Mills y Beber, 1995).

La movilización de especies exóticas desde zonas como Singapur, Tailandia, Hong-Kong, Japón y Malasia (Barnabé, 1991) conlleva obligadamente a la movilización de la carga bacteriana de estos peces, misma que al cambiar las condiciones ambientales y de producción e ingresar al tipo de granjas acuícolas rurales en condiciones sanitarias y de producción diferentes a las nativas, llega a variar su virulencia manifestándose enfermedades infecciosas (Negrete y Romero, 1999).

La introducción al país de especies exóticas lleva como consecuencia al incremento significativo de la diversidad de microorganismos patógenos en el ambiente, razón por la cual se han aislado, sistemáticamente de muestras de riñón de peces enfermos de *C. auratus*, bacterias de identificación dudosa con los sistemas de identificación bacteriana tradicional (Kinkelin *et al.*, 1985), cuya relación etiológica con su hospedero se desconoce y por lo tanto también su efecto sobre los sistemas acuícolas del país, sobre todo en granjas que como las

mencionadas carecen de condiciones sanitarias adecuadas (Negrete y Romero, 1998a).

El acuicultor al detectar signos de infección en su producción y tratando de resolver el problema, administra de manera indiscriminada antibióticos y otros químicos que seleccionan bacterias portadoras de plásmidos (Davis y Hayasaka, 1983; Hasting y Mc Kay, 1987; Madigan, *et al.*, 2000) fenómeno que lleva connotaciones graves en el ámbito de la salud pública, dado que estas bacterias son patógenas de especies que son manejadas por el humano, ya sea en el proceso de producción o como mascota.

Aunque los plásmidos no portan genes necesarios para el huésped, pueden ejercer profunda influencia en el fenotipo celular, llegando a codificar propiedades para la bacteria que los porta. La principal característica que determina la patogenicidad o virulencia de microorganismos es su habilidad de anclaje y colonización de sitios específicos del hospedero y la producción de sustancias tales como toxinas, enzimas y otras moléculas que inducen daño a éste. En algunas bacterias patógenas estas características están codificadas por plásmidos. La hemolisina es una proteína extracelular considerada como factor de virulencia producido por patógenos que contribuyen al establecimiento y mantenimiento de infecciones por acción sobre la membrana citoplasmática del huésped al lisar los eritrocitos. La virulencia de algunas bacterias ictiopatógenas ha sido relacionada con diferentes características bioquímicas (Toranzo y Barja, 1993). En *Vibrio anguillarum* se ha demostrado que la virulencia está relacionada con la presencia de plásmidos (Crosa *et al.*, 1987 y 1988).

El presente trabajo pretende estudiar de forma integral los problemas de orden sanitario que se generan en el proceso la producción intensiva de organismos acuáticos, desarrollando estrategias metodológicas para el estudio de bacterias

patógenas de alto riesgo para el cultivo de organismos acuáticos de importancia biológica, comercial y económica.

MARCO TEÓRICO

Las investigaciones efectuadas durante los pasados siglos, demostraron que una gran cantidad de enfermedades, tanto del humano como de animales y plantas, resultan del ingreso al cuerpo de ciertos agentes invisibles para el ojo humano pero capaces de ser vistos con la ayuda del microscopio.

Estas enfermedades infecciosas ocurren esporádicamente e infectan a un gran número de individuos, constituyéndose en epidemias o epizootias. Muchas de estas enfermedades tienen trascendencia nacional, internacional e inclusive hasta mundial, ya que han causado a la humanidad graves, dolorosas y cuantiosas pérdidas (Tortora *et al.*, 1997).

Antiguamente se designaba la palabra peste para referirse a cualquier enfermedad epidémica independientemente de sus síntomas o naturaleza. Sin embargo, hasta hace relativamente poco, las causas de estas enfermedades eran desconocidas para el ser humano. La asociación del microorganismo concreto como agente causal de la infección específica, esto es la teoría microbiana de las enfermedades infecciosas, debía pasar por el cumplimiento de una sucesión de eventos históricos- científicos para poder ser aceptada y comprobada experimentalmente.

Esta larga cadena de eventos tiene como primer antecedente el pensamiento mágico del hombre primitivo, cuyas ideas de causalidad están fuertemente conectadas con fuerzas sobrenaturales.

Posteriormente la teoría del *Contagium*, que contiene los orígenes a la explicación de que las enfermedades pueden comunicarse por contacto, se remonta a la costumbre de los antiguos egipcios y hebreos. En la Biblia se encuentran referencias a enfermedades contagiosas. De este modo, por ejemplo, las regulaciones Mosaicas para la lepra, así como su diagnóstico y control, son

minuciosamente descritas en Leviticus (cap. XII y XIV). La ley era extensiva en cuanto a la forma de proceder con el leproso y las posesiones directas del enfermo: la casa, ropas, muebles y alrededores (Yeast, 1819; Marxs, 1824; Berheim, 1877).

Muchas de estas ideas de transmisión por contagio de enfermedades se fueron perdiendo durante el periodo de los griegos y romanos, la mayoría de los estudiosos del tema coinciden en que en el Tratado Hipocrático no existe referencia al Contagio, sin embargo, gran número de escritores de la época entre ellos principalmente poetas, hacen alguna alusión a la naturaleza del contagio.

Esta teoría sobrenatural de la enfermedad, perduró por muchos siglos pero fue gradualmente desplazada por la idea de que la peste es originada de una forma natural, especialmente como fenómenos cosmo-telúrico, tales como terremotos, eclipses, cometas, y demás manifestaciones atmosféricas y particularmente por contaminación con los miasmas. Los cambios del aire, como resultado de los ciclos estacionarios o climáticos, fue el fundamento favorito de la Doctrina Patológica de Hipócrates. Justamente, así como el calor, el frío, lo seco, lo húmedo, se suceden a lo largo del año, explicaban que en el cuerpo humano se sucedían cambios análogos que influían sobre las enfermedades de la época.

En el mismo tratado Hipocrático sobre los humores, el aire es registrado como la causa de las enfermedades y expone que cuando el aire es infectado con miasmas, los cuales son hostiles, hacen que la gente llegue a enfermarse.

Aunque fueron muchas y muy importantes las aportaciones al conocimiento de gran variedad de enfermedades contagiosas efectuadas por los médicos del mundo Árabe y Oriental, no se lograron avances más allá de las doctrinas etiológicas hipocráticas (Bulloch, 1938).

Durante la Edad Media sobrevivieron gran cantidad de epidemias y epizootias que proporcionaron la oportunidad de reflexionar sobre la doctrina de la infección y contagio, así Jacobo da Forti y posteriormente Alessandro Benedetti fueron los primeros en aplicar la teoría del Contagio en sus tratados sobre las plagas. Este último no sólo sostuvo que las enfermedades pueden contagiarse por contacto, sino que también afirmó que el principio mórbido es embebido y retenido en los objetos usados por el enfermo (Omodei, 1822).

Los siguientes avances al conocimiento del contagio o de las infecciones los da Giorolamo Fracastoro, quien en su primer libro sobre la Teoría del Contagio lo definió como una infección que pasa de un individuo a otro. Plantea tres tipos de contagio: 1) Contagio por contacto solamente; 2) Contagio por fomites (ropa, cosas de madera u otro género, las cuales por sí mismas no están corruptas pero que preservan el germen original del contagio y dan lugar a transferirlo a otros objetos) y 3) Contagio a distancia, en esta categoría incluye enfermedades que pueden ser contraídas a distancia, tales como la peste, la tisis y exantemas, no todas son contagiosas a distancia pero todas son comunicables por contacto.

Fracastoro trató de probar la esencia del contagio y habla del "Seminaria de la Enfermedad", lo cual puede ser entendido como la "Semilla" o "Germen" de la enfermedad, entendiendo este concepto como exhalación, argumentó que el aire es apto para transmitir el contagio porque fácilmente capta la infección (Singer, 1792).

Estas especulaciones teóricas que sugieren la existencia de "Semillas o Gérmenes" de las enfermedades, encabezaron el establecimiento de la doctrina del *contagium animatum*, la cual recibió posteriormente bases objetivas que provienen del descubrimiento del microscopio a principios del siglo XVII, hecho que se atribuye a Cornelius Drebell y a Hans Zaccharia Janssen y de su demostración como herramienta de gran utilidad práctica, efectuada a través de

los descubrimientos de Antonio Van Leeuwenhoek, Robert Hooke, Luis Joblot, Benjamín Marten y Athanasius Kircher, referentes a principios vivientes constituidos por muy finos, pequeños e imperceptibles cuerpos con movimiento propio (Bulloch, 1938).

A pesar de todos los avances efectuados y la larga lista de aportaciones en el área del desarrollo del conocimiento del mundo microscópico, la demostración práctica de la relación entre los microorganismos y la enfermedad, no se podía llevar a su comprobación. Las doctrinas sobre las infecciones y enfermedades contagiosas eran nebulosas e inexactas. La idea de la especificidad de las enfermedades no existe aún hasta avanzado el siglo XVII, aunque si bien Thomas Sydenham reconoce claramente que hay diferentes enfermedades con síntomas y propiedades particulares, no las atribuye a una causa específica.

No fue sino hasta después de una serie de estudios detallados sobre anatomía patológica, que Bretonneau de Tours propone la Doctrina de la Especificidad Etiológica, manifestando que “el principio que genera enfermedad puede atacar en varios cuerpos y conservar sus propiedades tanto tiempo como le sea posible ejercer sus efectos deletéreos si este se introduce en un nuevo sujeto susceptible. Sin embargo, nunca intentó conectar el agente productivo de infección con los animáculos microscópicos (Coquerelle, 1869; Rolleston, 1924).

El hecho de relacionar a los “animáculos” con el contagio correspondió a Enrico Acerbi, quien postuló con base en sus estudios sobre la fiebre tifoidea la existencia de parásitos que tienen la capacidad de entrar al cuerpo, multiplicarse y provocar la enfermedad (Acerbi, 1822).

La demostración experimental, en el área de la Botánica, correspondió a Antonio Bassi en 1835, quien es reconocido como el fundador de la doctrina de los microorganismos patógenos de origen vegetal. Después de sucesivos

experimentos y metódicas observaciones de las enfermedades en el cultivo del gusano de seda, llegó a la conclusión de que el agente de la enfermedad era un hongo criptogámico de carácter parasítico. Bassi continuó desarrollando su doctrina del contagio por parásitos vivos en otras enfermedades como la viruela, tifo, sífilis, gangrena, cólera y pelagra; escribió sobre germicidas como el alcohol, el calor, ácidos, cloro y azufre; planteó el aislamiento de los enfermos de cólera y la desinfección de sus ropas y excretas. Por todo esto es considerado precursor de Schwann, Pasteur y Koch (Vittadini, 1852; Bulloch, 1938).

El siglo XIX se caracterizó por una gran cantidad de observaciones, sobre todo en el área médica, destacando el tratado de *Pathologische Untersuchungen* de Henle, en donde se postuló teóricamente la hipótesis que "el material del contagio no es solamente orgánico, es viviente también, está dotado de vida individual, se ubica en el cuerpo enfermo y en relación con la presencia de un organismo parásito." Consideró tres tipos de enfermedades epidémicas: 1) las miasmáticas, 2) las miasmáticas contagiosas; enfermedades tales como lepra, e influenza, y 3) las contagiosas; enfermedades como sífilis y rabia. Estableció el concepto de contagio como un tipo de miasmas en la segunda generación, entendido como el miasma que pasó su primer desarrollo en el cuerpo humano, es eliminado y comunicado al organismo sano igualmente por la atmósfera o por contacto, dando a entender que las descargas que provienen del cuerpo contienen las materias de infección. Henle, argumentó que el contagio debe de ser viviente; ".....el pus de viruela es pus más el contagio de viruela, hay un *stadium latentis* en el cual el contagio está incrementándose". Postuló, también, que al existir diferentes enfermedades miasmo-contagiosas, debe haber diferencias específicas en el agente contagioso, el cual en todos los casos es viviente, pero que aunque se había encontrado el agente en una enfermedad, esto pudo ser meramente accidental y no haber relación causal con la enfermedad. Emitió que para poder determinar lo anteriormente propuesto, el agente constantemente encontrado, debe ser aislado y probar que estos aislamientos producen enfermedad. Este constante

aislamiento-comprobación de los aislamientos, es la ineludible base sobre las cuales todos los subsecuentes trabajos sobre patogenicidad bacteriana se han construido, las declaraciones de Henle contienen los elementos para los postulados de Koch (Fildes y McIntosh, 1920).

Es hasta mediados del siglo pasado cuando los términos de contagio e infección llegaron a ser considerados semejantes. En un principio se consideraron procesos diferentes, aunque, esta diferencia no se había establecido. Para la mayoría de los investigadores de la época el término infección fue asumido como la comunicación de la enfermedad del individuo enfermo hacia el sano, a través de un miasma mórbido o exhalación difundida por el aire, mientras que contagio lo fue como la transmisión por mediación del contacto. Actualmente, el término infección ha suplantado al término contagio (Bulloch, 1938).

Las grandes pandemias de cólera, registradas tanto en Asia como en Europa, durante mediados del siglo XIX (1846-1875) proporcionaron los eventos para fundamentar las observaciones que llevaron a diferentes investigadores al establecimiento final de la teoría del *Contagium animatum*.

Las observaciones al microscopio de Brittan, Swayne y Budd (1849), éste último en muestras de agua para beber de las zonas de cólera, registraron la presencia de "cuerpos anulares"; mientras Pouchet en el mismo año reporta una inmensa cantidad de "animálculos" en muestras de contenedores de agua no potable, identificándolo como *Vibrio regula* de Müller, pero ninguno logró establecer alguna relación causal con la infección de cólera.

Después de sucesivas epidemias de cólera, John Snow (1849), demostró, por primera vez, la naturaleza del agua en estas epidemias y encabezó las afirmaciones acerca de que esta infección se inicia con el proceso alimentario y que el agua podría ser su vehículo, ideas que no fueron recibidas con entusiasmo.

No fue sino hasta la epidemia de cólera de agosto de 1854, en donde Snow trazó el origen de la misma a partir de un depósito de agua en donde encontró las evidencias de contaminación con materia orgánica.

Durante etapas tempranas de la microbiología, 1880, algunos prominentes microbiólogos dirigieron su atención al mar aplicando los métodos desarrollados para la microbiología de ambientes terrestres, improvisándolos intempestivamente a ambientes de agua salada. Los nuevos métodos se empezaron a poner en práctica a partir de 1950 (Umbreit, 1976).

Aunque la expedición del Challenger (1873-1876), se puede considerar como el punto de partida para establecer las bases para el estudio científico de la oceanografía, el estudio de los microorganismos marinos se inició hasta 1860-1875 con los trabajos pioneros de Certes, Regard Rusell y Fischer sobre la demostración de que las bacterias, levaduras y hongos pueden ser encontrados en partes de los océanos contaminados directamente por la tierra. A pesar de las ideas prevalecientes hasta ese momento respetando los flujos abiogénicos y la naturaleza no microbiológica del mar, se sentaron las bases para los actuales estudios (Litchfield, 1976).

Giaxa, entre otros, se constituirá en el pionero de la bacteriología de organismos acuáticos al iniciar estudios del análisis bacteriológico en agua y organismos acuáticos. Trabajos posteriores sobre microbiología acuática, entre los años de 1880 y 1890, describieron los primeros métodos de purificación y análisis de agua en organismos acuáticos destacando las contribuciones de Certes en 1824 sobre el estudio de las esquizogregarinas como parásitos de tunicados, anélidos artrópodos y moluscos marinos (Litchfield, 1976); Emmerich y Weibel (1894), en Europa, inician la descripción de infecciones de origen bacteriano, como la furunculosis en peces. Zobell (1934), amplía sus aportaciones, dentro de la

microbiología acuática, al estudio de organismos patógenos de peces de vida libre.

En esta etapa incipiente de la micropatología, las infecciones en organismos acuáticos cultivados no eran consideradas de mayor importancia, mucho menos las de organismos de vida libre.

Con el avance en el desarrollo de la acuicultura, con fines deportivos o reproductivos de especies comestibles o de ornato, el confinamiento de un gran número de organismos acuáticos en espacios limitados de agua, tales como estanques, canales y jaulas, ha incrementado la manifestación de enfermedades de diversa índole en organismos acuáticos cultivados, ocasionando mortalidades de magnitud variable que dependiendo del agente causal las pérdidas pueden llegar a ser hasta del 100% de la producción, cambiando completamente el panorama del desarrollo del estudio de las causas, diagnóstico, control y prevención de las infecciones de organismos acuáticos, tanto para cultivo como de vida libre. Este cambio que se aprecia durante el desarrollo de la ciencia del siglo XX, durante el cual se registraron 348 artículos publicados en revistas especializadas (*Bacteriological Review* y *Biological Abstracts*), 93 diferentes especies de nuevos patógenos de interés ictiopatógeno de los cuales: 66 son diferentes especies de bacterias, entre ellas *Vibrio anguillarum*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Aeromonas salmonicida* fueron las más estudiadas, sobre todo en las tres últimas décadas del siglo, debido a los graves daños que ocasionan estas en los cultivos; once especies de hongos, sobre todo de los géneros *Achlya* y *Saprolegnia* y cuatro especies de Protozoarios: *Chylodonella*, *Ichthyosporidium*, *Myxosoma squamata* y *Myxosporidium* sp, igualmente patógenos de organismos acuáticos.

El estudio de los diferentes patógenos de organismos acuáticos, logra nuevamente desarrollo paralelo a la tecnología de la microscopía, ya que no es

sino hasta la década de los ochenta en que se inicia el registro de los virus como patógenos de organismos acuáticos, sobre todo en crustáceos, detectándose hasta 13 nuevas especies. Así también, es importante el registro de la presencia de plásmidos en patógenos de peces, hecho que indica la contaminación por antibióticos, por el control químico de las enfermedades, en etapas tempranas (Tablas 1 y 2).

Tabla 1. Microorganismos patógenos de organismos acuáticos reportados de 1970 a 1991 en el Biological Abstracts.

Especies	Número de Publicaciones por Década								
	20	30	40	50	60	70	80	90	Totales
BACTERIAS									
<i>Aerobacter</i>				1	2				3
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>		1							1
<i>Achromobacter inohodermis</i>		1		1	2				4
<i>Aeromonas salmonicida</i>					3		1	10	14
<i>Aeromonas aerogenes</i>						1	5	5	11
<i>Aeromonas sobria</i>								1	1
<i>Aeromonas masoucida</i>								1	1
<i>Aeromonas achromogenes</i>								1	1
<i>Allomyces arbuscula</i>									3
<i>Alcaligenes sp</i>									2
<i>Aeromonas piscicola</i>									1
<i>Bacillus salmonicida</i>	3	1		1	1				6
<i>Bacterium salmonicida</i>				1					1
<i>Bacterium cyprimidiae</i>	1								1
<i>Bacterium coli</i>	3								3
<i>Bacterium typhosa</i>	1								1
<i>Bacterias (no se indica sp)</i>	1	1	3	4	9	3	3	4	28
<i>Brevibacterium</i>					2				2
<i>Citrobacter freundii</i>						1			1
<i>Cytophaga sp.</i>						3			3
<i>Chonrodiscocus columnaris</i>				1					1
<i>Enterococcus sp</i>	1								1
<i>Escherichia coli</i>				1	2		1		4
<i>Edwardsiella ictaluri</i>							6	1	7
<i>Exophilia pisciphila</i>								1	1
<i>flavobacterium fuscum</i>								1	1
<i>Flexibacter columnaris</i>						1	2		3
<i>Flavobacterium freundii</i>				1	1		1		3
<i>Klebsiella sp</i>							3		3

<i>Micrococcus roseus</i>		1		2	2				5
<i>Mycobacterium marinum</i>	1			2					3
<i>Mycobacterium playpoecilis</i>	1								1
<i>Mycobacterium piscium</i>									1
<i>Mycobacterium neoaurum</i>									2
<i>Osphronema guramy</i>								1	1
<i>Pasterurella piscicola</i>								3	3
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1			1	1		1	3	7
<i>Pseudomonas vulgaris</i>				2	2	2			4
<i>Pseudomonas punctata</i>		1		2	1				4
<i>Pseudomonas aerogenoides</i>				1					1
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>							4		4
<i>Pleisomonas shigelloides</i>		1						1	1
<i>Proteus vulgaris</i>		1			2				3
<i>Reninbacterium salmoninarum</i>							1	4	5
<i>Rhodococcus</i>								1	1
<i>Salmonella</i>		1		1	1		1		4
<i>Shigella sp</i>				1		1	1		3
<i>Serratia liquefaciens</i>									1
<i>Stafylococcus</i>								1	1
<i>Streptococcus</i>					1		1	1	3
<i>Vibrio sp</i>		1		1			3	4	9
<i>Vibrio anguillarum</i>						6	13	10	29
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>						3		4	7
<i>Vibrio aqualitis</i>		1						1	2
<i>Vibrio desulfuricus</i>								1	1
<i>Vibrio harvey</i>								1	1
<i>Vibrio splendidus</i>								1	1
<i>Vibrio alginolyticus</i>								2	2
<i>Vibrio fluvialis</i>								4	4
<i>Vibrio damsela</i>								1	1
<i>Vibrio cholerae</i>							1	1	2
<i>Vibrio ordalii</i>								1	1
<i>Vibrio salmonicida</i>							2	2	4
<i>Yersinia sp.</i>							3		3
<i>Yersinia ruckeri</i>							1	4	5
No de articulos	15	8	3	24	35	27	61	77	250
No de especie reportadas	11	8	1	18	17	17	25	31	66
HONGOS									
<i>Achyla sp.</i>		1	1		1	12	15		30
<i>Aphanomyces helicoidales</i>					1		1		2
<i>Dictyuchus serile</i>							1		1
<i>Oomycetes</i>								1	1
<i>Phycomycete</i>								1	1
<i>Saprolegnia chinensis</i>								1	1
<i>Saprolegnia parasitica</i>		3	3	1	1		1		9
<i>Saprolegnia diclina</i>					1		1		2
<i>Oidium sp</i>	1	1							2

<i>Dermaticeae</i>	1								1
<i>Entomophthoraceae</i>	1	1							2
No de artículos	3	6	4	1	4	12	19	3	52
No de especies reportadas	3	4	2	4	4	1	5	1	11
VIRUS									
<i>C.C.V. (enfermedad viral del pez gato)</i>							3		3
<i>C.S.V. (Viremia primaveral de la carpa)</i>							2		2
<i>Herpevirus</i>							1		1
<i>Herpevirus salmonis</i>							1	2	3
<i>I.N.P. (Necrosis pancreática viral)</i>							1	4	5
<i>I.H.N.V. (Necrosis hematopoyética viral)</i>							5	3	8
<i>I.S.H.V. (Septicemia hemorrágica viral)</i>							2	2	4
<i>I.H.V. (Infección hematopoyética viral)</i>							2	1	3
<i>Rabdovirus</i>								1	1
<i>Píconavirus</i>						1	1		2
<i>Plásmidos</i>							1	1	2
<i>Virus</i>						9	1	3	13
Número de artículos						10	11	8	12
Número de especies						20	20	17	47
PROTOZOOARIOS									
<i>Chylodonella</i>		1							1
<i>Ichthyosporidium</i>	1	2							3
<i>Myxosoma squamata</i>					1	1	2		4
<i>Myxosporidium sp</i>							1		1
Número de artículos	1	3			1	1	3		9
Número de especie	1	1			1	1	2		4
Total de artículos	19	17							348
Total de especies	19	17	4	25	40	43	103	97	93

Tabla 2. Microorganismos patógenos de organismos acuáticos, reportados de 1980 a 1990 en el Bacteriological Review.

Especies	Décadas		
	80	90	Totales
BACTERIAS			
<i>Acinetobacter sp</i>	2		2
<i>Aeromonas hydrophila</i>	5	4	9
<i>Aeromonas salmonicida</i>	29	17	46
<i>Aeromonas punctata</i>	2	2	2
<i>Aeromonas caviae</i>		1	1
<i>Aeromonas sobria</i>	2	1	3
<i>Bacterias (no determinan especie)</i>	13		13
<i>Edwardsiella sp</i>		2	2
<i>Enterobacterias</i>	1		1

<i>Escherichia coli</i>	1		1
<i>Flexibacter sp</i>	1		1
<i>Flexibacter columnaris</i>	1		1
Gram (-)	2		2
<i>Klebsiella sp</i>		1	1
<i>Mycobacterium</i>	1		1
<i>Peasterurella</i>		1	1
<i>Pseudomonas</i>	3		3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1		1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1		1
<i>Reninbacterium</i>	1	2	3
<i>Salmonella</i>	1		1
<i>Staphylococcus</i>	1		1
<i>Vibrio sp</i>	15		15
<i>Vibrio angillarum</i>	4	4	8
<i>Vibrio alginolyticus</i>	1		1
<i>Vibrio salmonicida</i>	2	3	5
<i>Vibrio vulnificus</i>	1		1
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	14		14
<i>Yersinia ruckeri</i>	3		3
HONGOS			
<i>Actinomyces</i>	1		1
VIRUS			
Virus (no especificados)	1		1
Número de artículos	110	39	149
Número de especies	27	12	31

También se incrementa el estudio de diferentes especies de organismos acuáticos, señalando las especies de mayor interés ya sea económico o científico reportadas durante las dos últimas décadas en esos momentos, registrándose enfermedades infecciosas en 49 especies diferentes. En peces los Cyprinidos y Salmónidos muestran mayor interés, siguiendo los reptiles y anfibios en diferentes estadios de desarrollo (Tablas 3).

Inicialmente las enfermedades que se reportaron fueron diferentes tipos de micosis, enteritis y bacteriosis, siendo la más común la furunculosis.

Tabla 3. Organismos acuáticos hospederos de microorganismos patógenos.

Especies hospederas	Bacteriological	
	Review	Totales
<i>Ascidias</i>	1	1
Anfibios	2	2
<i>Artemia salina</i>	1	1
<i>Anguilla japonica</i>	1	3
<i>Brevoita tyrannus</i>	1	1
<i>Carassius auratus</i>	6	1
<i>Clupia harengues</i>	1	1
<i>Cyprinus carpio</i>	14	21
<i>Carassius monodon</i>	1	1
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	1	1
<i>Catta catta</i>	1	1
<i>Cirrhinus migala</i>	1	1
<i>Gadus morhua</i>	2	2
Holoturias	1	1
Huevos	3	3
<i>Ictalurus punctatus</i>	8	9
<i>Lacerta ajilis</i>	1	1
<i>Labelo rohita</i>	1	1
<i>Misgrus unguilicaudatum</i>	1	1
<i>Morone misanipiensis</i>	1	1
<i>Mercenaria mercenaria</i> y <i>Ostrea gigas</i>	6	6
<i>Ostrea gigas</i>	1	1
<i>Ophicephalus punctata</i>	1	1
<i>Oncorhyncus mykiss</i>	8	1
<i>Oncorhyncus masou</i>	4	1
<i>Oncorhyncus keta</i>	5	2
<i>Oncorhyncus kitsuch</i>	4	4
<i>Osphronemus guramy</i>	1	1
<i>Perca fluviatilis</i>	1	1
Peces (no especifica)	50	4
<i>Pleurogrammus monopecterigius</i>	4	4
<i>Plecoglossus altivelis</i>	1	1
<i>Pseudopleuronectes americano</i>	1	1
<i>Promobolus pseudoharinges</i>	1	1
<i>Penaeus monodon</i>	3	8
<i>Pleuromichthys</i>	1	1
<i>Poecillia reticulata</i>	2	2
<i>Rana pipiens</i>	3	3
<i>Rutilus rutilus</i>	1	1
Reptiles (no se especifica)	1	2
<i>Salmo salar</i>	12	28
<i>Salmo trutta</i>	19	19
<i>Salvelinus fontinalis</i>	7	7

<i>Salmo gairdneri</i>	9	15	24
<i>Salmo clarkii</i>	3		3
<i>Stophthalmus maximus</i>	2		2
<i>Stizostedion vitreum</i>	1		1
<i>Tinca tinca</i>	1		1
Total de especies	49	15	64

Como se analizó anteriormente, hasta la década de los ochentas se registran los primeros descubrimientos de especies víricas patógenas de peces, por tal motivo hasta entonces es que se inicia también el reporte de infecciones virales en organismos acuáticos (Tabla 4 y 5).

El nivel de aproximación al objeto de estudio de la Micropatología Acuática varía desde sus primeras fases de detección y descripción de las diferentes etiologías e identificación y caracterización de los diversos patógenos aislados de los hospederos anteriormente mencionados durante las primeras décadas del siglo pasado (1920-1960), hasta las fases de control químico, inmunoprotección y biología molecular (1970-2000).

En los inicios del siglo XXI, el nivel de estudio de esta área del conocimiento ha logrado ir avanzando paralelamente al desarrollo de la tecnología, explicando la ictiopatología a nivel molecular, tanto para la caracterización de los patógenos como para explicar los determinantes patogénicos en estos organismos (Tablas 6 y 7).

Tabla 4. Enfermedades causadas por microorganismos patógenos a organismos acuáticos reportados en el Biological Abstracts.

Enfermedad	Número de publicaciones por década								Totales
	20	30	40	50	60	70	80	90	
Blastomicosis								1	1
Dermatitis		2			1			2	5
Deformación de la cabeza					1				1
Enfermedad púrpura			1						1
Enteritis	1								1
Endomicosis			1						1

Eritro-dermatitis						1	1	2
Enfermedad de las agallas						1		1
Encefalomiелitis							1	1
Furunculosis	3	2	2		4	7	2	28
Falta de secreción de moco				1				1
Granuloma sistemático							1	1
Gastroenteritis				1				1
Hiperplasia de las agallas						2		2
Linfocitis ocular						1		1
Micosis	1	2	1	2	1		1	8
Necrosis pancreática						2	4	
Necrosis intestinal							1	1
Necrosis hematopoyética							4	4
Panoftalmitis							1	1
De la Boca Roja						1	3	4
Esferosporosis de las agallas							2	2
Septicemia hemorrágica		1					6	7
Sarcoma dermal							2	2
Úlcera de la piel		1						1
Vibriosis							2	2

En el contexto mundial durante las tres primeras décadas del siglo XX, Alemania, Estados Unidos, Gran Bretaña y Canadá marcaron el liderazgo en cuanto a producción científica en el área de la micropatología de organismos acuáticos, misma que durante la década de los cuarentas se suspende dramáticamente, se puede suponer que fue debido a la Segunda Guerra Mundial. Para 1991, la cantidad de artículos publicados en el ámbito internacional será seis veces mayor, marcando ahora el liderazgo Estados Unidos, Japón, Canadá, Alemania y Noruega (Tabla 8).

Tabla 5. Enfermedades causadas por microorganismos patógenos a organismos acuáticos reportados en el Bacteriological Review.

	Número de publicaciones por década		
	80	90	Totales
Dermatitis	3	2	5
Furunculosis	16	4	20
Infecciones	3		3
Salmonelosis	3		3
Septicemia	2	5	7

Síndrome ulcerativo		2	2
Necrosis hematopoyética	1		1
No especificada	1	34	34
De la boca roja	1		1
Vibriosis	5		5

Tabla 6. Producción científica en el Área de Sanidad Acuícola (Biological Abstracts).

Área de Conocimiento	Número de publicaciones por década								Totales
	20	30	40	50	60	70	80	90	
Biología Molecular							3	10	13
Control Genético								1	1
Control Químico	1		2	4		6	4	6	20
Detección y Diagnóstico	3	5	1	8	9	8	8	11	53
Etiología	1	3	3	2		2	1	1	14
Epidemiología		1	1	1	2	3			8
Genética						1	2	2	5
Histopatología								8	8
Historia	1							1	2
Inmunología		1	1			4	16	18	60
Identificación y caracterización	5				4	8	1	3	16
Profilaxis			1	3	4	6	3	7	25
Sanidad					1				1
Serología Inmunodetección						4	6	2	12
Técnicas	1			1		1		1	4
Taxonomía				3		3	4		10
Distribución y Ecología			1	1	2	3	3		10

Tabla 7. Producción científica en el Área de Sanidad Acuícola (Bacteriological Review).

Área de Conocimiento	Número de publicaciones por década		Totales
	80	90	
Biología Molecular	4	7	11
Control Genético			
Control Químico	4	5	9
Detección y Diagnóstico	30	5	35
Etiología	14	12	26
Epidemiología		2	2
Distribución y Ecología	2	4	6
Genética	1		1
Histopatología	1	3	4

Inmunología	34	7	41
Identificación y Caracterización	8	0	8
Profilaxis			
Sanidad			
Serología Inmunodetección	1		1
Técnicas			
Taxonomía	4	3	7

La peste bovina de 1920 en Bélgica, causada por el paso de ganado de cebú enfermo por Ámsterdam con destino a Brasil, motivó la creación de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) la cual por Convenio Internacional del 25 de enero de 1924 se le asignó la función de: “Promover y coordinar las investigaciones relacionadas con la vigilancia y el control de las enfermedades animales en el mundo”.

Integrada por 162 países, hasta 2002 ha establecido representaciones en las regiones de Asía-Pacífico, Europa Oriental y Central, Oriente Medio y América, ofreciendo servicios adaptados a estas regiones para reforzar la vigilancia y el control de las enfermedades animales en cada una de ellas (OIE, 2000).

En México las actividades científicas dentro de la Patología Acuática se inician oficialmente en 1977 con la creación de la Oficina de Sanidad y Nutrición, anexándose en 1977 el área de Genética, la cual pasará sucesivos cambios hasta constituirse en 1992 en la Dirección General de Acuicultura perteneciente a la Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAP), en la actualmente Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural y Pesca (SAGARPA).

Tabla 8. Producción científica por países en el Área de Sanidad Acuicola de 1920- 1999 (Biological Abstract).

País	1920/1929	1930/1939	1940/1949	1950/1959	1960/1969	1970/1979	1980/1989	1990/1999	Totales
África									
Alemania	6	2		1			1	4	2
Australia							1	1	13
Bélgica							1	1	2
Bulgaria		1						2	2
Canadá	3	2		1	2	2	5	7	22
Dinamarca							5	2	7
Escocia					1	1	1	5	8
España					1		1	2	4
Estados Unidos de América	4	4		7	4	13	15	17	64
Francia	1	2		1		2		4	9
Filipinas								1	1
Gran Bretaña	3	2		2	1	3			11
Holanda					1				1
India								2	2
Israel					1				1
Islandia						2		4	6
Italia				2		1	2	1	6
Japón				3		2	20	7	33
Noruega					1		4	6	12
Polonia				1				1	2
Praga								1	1
Rusia				1	1				6
Suecia					1	2	2		1
Viena	1				1				1
Total	18	14		19	15	29	57	69	218

La Dirección General de Acuicultura a través de la Dirección de Control y Sanidad Acuícola se constituyó en la entidad gubernamental del Programa de Pesca responsable para elaborar las Normas Oficiales Mexicanas sobre Sanidad Acuícola, para reglamentar la actividad acuícola en los rubros de movilización, importación y exportación de especies acuáticas; establecimiento de cuarentenas; calidad sanitaria del alimento para especies acuáticas y puntos críticos de control de manejo sanitario de las granjas acuícola.

Las normas emitidas por la entonces Secretaría de Pesca y Secretaria de Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca son:

(a) NORMA Oficial Mexicana NOM-010-PESC-1993, que establece los requisitos sanitarios para la importación de organismos acuáticos vivos en cualquiera de sus fases de desarrollo, destinados a la acuicultura u ornato, en el territorio nacional. Esta norma tiene como objeto establecer los requisitos sanitarios para organismos acuáticos vivos en cualquiera de sus fases de desarrollo, sujetos a importación, a fin de minimizar los riesgos de introducir y dispersar algún agente causal de enfermedades.

(b) NORMA Oficial Mexicana NOM-011-PESC-1993, para regular la aplicación de cuarentenas, a efecto de prevenir la introducción y dispersión de enfermedades certificables y notificables, en la importación y /o movilización de organismos acuáticos en cualesquiera de sus fases de desarrollo, destinados a la acuicultura y ornato en los Estados Unidos Mexicanos.

En los apartados 3.2 y 3.3 de la misma se define como enfermedades certificables: aquéllas contenidas en las regulaciones internacionales, principalmente las que no tienen tratamiento actual conocido o que son de muy difícil controlar y causan altas mortalidades, incluidas en el Apéndice C. Normativo. “Enfermedades Certificables de las Especies de Organismos Acuáticos

Vivos en cualquiera de sus Fases de Desarrollo Destinados a la Acuicultura y Ornato"; y como enfermedades notificables aquellas que son susceptibles de tratamiento y que no causan altas mortalidades, incluidas en el Apéndice D Normativo. "Enfermedades Notificables de las Especies de Organismos Acuáticos Vivos en cualquiera de sus Fases de Desarrollo Destinadas a la Acuicultura u Ornato en los Estados Unidos Mexicanos".

Se considera como enfermedad bacteriana CERTIFICABLE a :

Renibacterium salmoninarum agente causal de la infección sistémica que puede ser crónica aguda o sub-aguda.

Dentro de las enfermedades de origen bacteriano todas ellas NOTIFICABLES se registran:

ENFERMEDAD	AGENTE CAUSAL
Aeromoniasis.	<i>Aeromonas spp</i>
Furunculosis.	<i>Aeromonas salmonicida salmonicida</i>
Septicemia.	<i>Aeromonas hydrophila</i>
Vibriosis.	<i>Vibrio spp</i>
Septicemia.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Enfermedad de la boca roja (ERM).	<i>Yersinia ruckeri</i>
Columnaris, Enfermedad columnar.	<i>Flexibacter columnaris</i>
Mycobacteriosis o tuberculosis.	<i>Mycobacterium spp</i>
Nocardiosis.	<i>Nocardia spp.</i>
Edwarsellosis.	<i>Edwarsiella tarda</i>
Septicemia.	<i>Edwarsiella ictaluri</i>
Pasteurelosis.	<i>Pasteurella spp.</i>
Enfermedad del agua fría.	<i>Cytophaga psycrophila</i>

Enfermedad del riñón grande.

Lactobacillus piscicola

(d) NORMA Oficial Mexicana NOM.030-PESC- 2000, que establece los requisitos para determinar la presencia de enfermedades virales de crustáceos acuáticos vivos, muertos, sus productos o subproductos en cualquiera presentación y *Artemia (Artemia spp.)*, para su introducción al territorio nacional y movilización en el mismo.

Hasta la fecha se encuentran como proyectos de Norma los siguientes:

(a) PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROYECTO NOM-020-PESC-1993, que acredita las técnicas para la identificación de agentes patógenos causales de enfermedades en los organismos acuáticos vivos cultivados, silvestres y de ornato en México. A fin de que con base en los resultados se recomiende el tratamiento a ser aplicado y se expidan los certificados correspondientes.

Para fines de estas Normas en el punto 3.14 agente causal de enfermedad son virus, bacterias, hongos, helmintos, protozoarios y crustáceos parásitos, metales pesados, plaguicidas, toxinas, alteraciones de los parámetros físicos y químicos del agua y deficiencias, antagonismos o desbalances de los ingredientes de los alimentos balanceados. Y en el punto 3.15 se considera enfermedad cualquier desviación de la estructura o función normal de los organismos e incluye aquellos estados que resulten de las actividades de agentes infecciosos, invasión de parásitos y anomalías genéticas y ambientales inducidas.

(b) PROYECTO de Norma Oficial Mexicana NOM-021-PESC- 1994, que regula los alimentos balanceados, los ingredientes para su elaboración y los productos alimenticios convencionales y no convencionales, utilizados en la acuicultura y el ornato, importados y nacionales para su comercialización y consumo en la República Mexicana.

Establece entre otros en el punto 4.6 de la misma Norma que los límites bacteriológicos para alimentos, sus ingredientes y alimentos no convencionales será de menos de 10,000 aerobios/g, sin coliformes, mientras que para harina de hueso deberá tener menos de 1,000 aerobios /g y estar sin *Escherichia coli* .

(c) PROYECTO de Norma Oficial Mexicana NOM-022-1994, que establece las regulaciones de higiene y su control, así como la aplicación del sistema de riesgos y control de puntos críticos en las instalaciones y procesos de las granjas acuícola.

Tiene como objeto establecer las prácticas de higiene para la acuicultura, con la finalidad de prevenir y controlar los agentes causales de enfermedades en granjas acuícolas, que permita producir pescado inocuo de elevada calidad para el consumo humano. En él se exponen factores higiénicos fundamentales, desde la selección del emplazamiento del establecimiento de acuicultura hasta la fase final de la producción de organismos acuáticos cultivados, a partir de la implementación de Sistemas de Análisis de Riesgos y Control de Puntos Críticos en todas las fases del proceso.

Un estanque de cultivo es un sistema con tres entradas al sistema: el agua, el alimento tanto balanceado como vivo y los mismos organismos en cultivo en cualesquiera de sus fases, que desde el punto de vista de la micropatología acuática, pueden incorporar también a los sistemas de cultivo microorganismos patógenos.

Cuando este sistema no se encuentra en las condiciones sanitarias de manejo de la producción en óptimas condiciones y el equilibrio hospedador-patógeno-ambiente se altera, puede presentarse el estado de enfermedad.

Así entonces, para entender la relación que guardan estos tres elementos Snieszko (1973) propone el siguiente modelo del estado de salud-enfermedad de organismos acuáticos en cultivo.

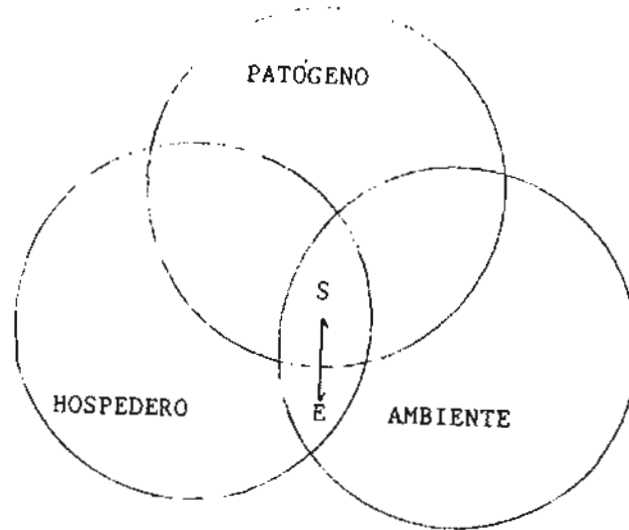


Figura 1 Modelos del balance salud-enfermedad en un sistema acuático (Snieszko, 1973).

Para que se presente el estado de infección en un sistema acuícola, el hospedero debe ser susceptible, el huésped debe ser virulento, debe encontrarse una cantidad tal ($D_{50}L$) que pueda inducir la infección y las condiciones ambientales deben de ser propicias como por ejemplo, temperatura inadecuada para el cultivo, mala calidad física, química y bacteriológica del agua, elevada densidad de carga, presencia de contaminantes y mal manejo de las instalaciones.

Siguiendo el modelo anteriormente mencionado, se pueden presentar tres variantes: 1) si el patógeno y el hospedero no coinciden espacio-temporalmente la infección no se manifiesta; 2) aunque el hospedero y el patógeno coincidan en el mismo lugar, la enfermedad infecciosa puede no manifestarse, ya que las condiciones ambientales favorecen al hospedero, manteniéndose el cultivo en las condiciones óptimas (oxígeno disuelto, calidad y cantidad de agua adecuadas,

densidad de carga de acuerdo a la especie y al tamaño del estanque, entre otras especificaciones) en esta situación se puede presentar el estado de portador, esto significa que existe la infección más no la enfermedad, misma que puede manifestarse en cualquier momento en que las condiciones ambientales cambien, favoreciendo en esta ocasión al patógeno, o bien, el estado de salud del hospedero se alteren y 3) la enfermedad se presentará cuando el patógeno virulento junto con el hospedador, sea susceptible un ambiente desfavorable para el hospedero (las condiciones de manejo anteriormente mencionadas inadecuadas para la especie en cultivo).

Luego entonces, según Piper (1992), la enfermedad es la alteración del estado normal o saludable de un organismo causando malestar, enfermedad o la muerte, aunque, considerando el modelo de Snieszko (1973) y en un contexto ecológico, enfermedad es el resultado de la interacción entre los estímulos de las condiciones ambientales sobre los sistemas biológicos (Michel, 1982).

El ambiente acuático, en este caso en particular, entendiéndose por calidad de agua, puede afectar directamente la salud de los organismos acuáticos, resultando del efecto nocivo del factor físico y químico y del estrés al que se somete directamente a éstos, o bien indirectamente cuando estos factores estimulan o favorecen el crecimiento de bioagresores.

Los componentes del ambiente que tienen mayor influencia directa sobre los organismos acuáticos cultivados son:

1. El oxígeno y CO_2 disuelto en el agua, las sustancias nitrogenadas y la turbiedad.
2. El carácter ácido o básico del agua.
3. El contenido de calcio y magnesio en el agua.
4. La salinidad.

5. Los gases disueltos.
6. La alimentación: racionamiento y calidad tanto bromatológica como bacteriológica.
7. Los traumatismos.
8. La temperatura.
9. La luz y los rayos ultravioletas.

Todos estos parámetros están interrelacionados y su relación, así como su buen manejo determinará en menor o mayor grado la susceptibilidad del sistema a las enfermedades y la gravedad de las mismas (Kinkelin *et al.*, 1985).

Los grupos de organismos que pueden causar enfermedad incluyen a los virus, bacterias, hongos, protozoarios, rickettias, levaduras, algas y un amplio intervalo de invertebrados. Todos categorizados en dos grandes grupos: patógenos y parásitos. En el primer grupo se incluyen a todos los microorganismos subcelulares y unicelulares y en el segundo grupo a los multicelulares (Piper, 1992).

Las bacteriosis son enfermedades particularmente temidas por los acuicultores, ya que raramente son específicas y pueden permanecer desapercibidas por largo tiempo, además de que gran cantidad de ellas son patógenos, de humanos también. Algunas especies ejercen su poder patógeno únicamente de forma secundaria, otros agentes etiológicos actúan de forma conjunta, como es el caso de la furunculosis, bacteriosis que se atribuye a la acción conjunta de *Aeromonas salmonicida* y *Aeromonas hydrophila*.

La clasificación en su totalidad de las enfermedades bacterianas así como los agentes bacterianos reconocidos como responsables, no puede ser determinados con precisión, ya que algunos agentes etiológicos de éstas no han sido identificados con exactitud y a que las descripciones clínicas, aparentemente

unívocas, pueden manifestar causas múltiples y a veces combinadas, otras más han desaparecido al comprobarse que el agente responsable correspondía a otro patógeno, situación que se ha presentado en casi todas las bacterias de interés ictiopatógeno, por los cambios efectuados por las clasificaciones bacterianas (Kinkelin *et al.*, 1985).

De esta manera para Roberts *et al.*(1993), pueden existir muchas patologías diferentes pero solamente hay tres respuestas típicas: la respuesta septicémica, la respuesta con dermomionecrosis focal ulcerativa y la respuesta crónica proliferativa, las cuales pueden presentarse simultáneamente o bien por etapas dependiendo del patógeno y que se describen de la siguiente forma:

1. En la respuesta septicémica, el principal acontecimiento en estos procesos es la presencia de bacterias en todos los órganos del pez infectado, las lesiones incluyen hiperemia de capilares, petequias hemorrágicas y exoftalmia con edema periorbital.
2. La respuesta dermomionecrosis focal ulcerativa, puede presentarse conjuntamente con la septicemia, la bacteria puede encontrarse en músculo y en epidermis, al elaborar las necrotóxicas y proteasa, se pueden registrar necrosis en los tejidos. La furunculosis y las vibriosis son infección que presentan este tipo de lesiones.
3. La respuesta crónica proliferativa, es particularmente común en los tejidos hematopoyéticos y se caracteriza por las constantes necrosis seguidas por la reparación del tejido, típicas de micobacterias, enfermedades bacterianas en riñón y otras enfermedades crónicas.

Muchas especies dentro del grupo de bacterias Gram (-) ya han sido experimentalmente confirmadas como patógenos de organismos acuáticos,

algunas como patógenos estrictos y otras como oportunistas, por ejemplo: *Aeromonas salmonicida* (Mc Graw, 1952), *Pseudomonas chlororaphis* (Waluga, 1962), *Yersinia ruckeri* (Ross et al., 1966), *Vibrio anguillarum* (Cisar y Fryer, 1969), *Aeromonas salmonicida* subsp. *masoucida* (Kimura, 1970), *Flexibacter columnaris* (Pacha y Ordal, 1970), *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Kimura y Kitao, 1971), *Pseudomonas anguilliseptica* (Wakabayashi y Egusa, 1972), *Edwardsiella tarda* (Meyer y Bulloch, 1973), *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* (Mac Carthy, 1975), *Aeromonas hydrophila* (De Figuereido y Labarta, 1968), *Edwardsiella ictaluri* (Hawke et al., 1981), *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (Love et al, 1981), *Vibrio ordalii* (Ranson et al., 1984) y *Vibrio salmonicida* (Egidius et al., 1986).

Rodríguez y Ribeiro (1995), evaluaron los efectos de virulencia de las especie *V. fluvialis* y *V. mimicus* aisladas de mariscos, obteniendo resultados positivos. Austin y Austin (1994), en experimentos diseñados con el objetivo de determinar la patogenicidad en diferentes especie de *Vibrio*: *V. alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. diazotrophicus*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. harveyi*, *V. hollisae*, *V. logei*, *V. marinus*, *V. nereis*, *V. metchnikovii*, *V. mimicus* y *V. mytili*, sólo produjeron efecto *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* en trucha arco iris.

Sin embargo, debido a la descarga de contaminantes y desechos urbanos y rurales directamente a los flujos de agua que surten los estanques de cultivos de las granjas acuícolas, la calidad bacteriológica del agua usada en estos cultivos ha disminuido incrementando la variedad de especies bacterias aisladas de estos ambientes. Se han aislado muchas bacterias directamente del riñón de peces cultivados cuya relación etiológica con el hospedero aún es desconocida (Negrete y Romero, 1998 a)

La familia *Vibrionaceae* incluye 20 géneros diferentes de los cuales ocho son reportados como patógenos de peces (Colwell y Grimes, 1984). Para Egidius

(1987), únicamente cinco géneros pueden ser considerados ictiopatógenos: *V. anguillarum*, *V. ordalii*, *V. damsela*, *V. carchariae*, y *V. salmonicida*, que son causantes de las infecciones que han ocasionado pérdidas económicas más severas en cultivos acuáticos de diferentes especies.

Algunas de estas bacterias pertenecientes a la familia de las *Vibrionaceae* y *Aeromonadaceae*, son objeto actualmente de muchos trabajos que conducirán a cambios en las taxonomías ya conocidas. El renovado interés por las ciencias ambientales ha estimulado el desarrollo de la microbiología de las aguas residuales, cuyas técnicas en principio aplicadas a los gérmenes indicadores de contaminación ambiental, comienzan aplicarse con buenos resultados a las bacterias patógenas de peces, de tal manera de que se ampliará la lista de patógenos de peces, como es el caso de *Vibrio fluvialis*, descrita por Lee *et al.* (1981) cuya semejanza con *Aeromonas hydrophila* llama la atención desde el punto de vista de los caracteres fenotípicos (Kinkelin *et al.*, 1985). Esta bacteria ha sido aislada de diferentes tipos de muestras procedentes de agua y de pacientes humanos con diarrea, pero, hasta la fecha no se ha registrado ningún reporte científico de esta especie bacteriana como patógena de peces de ornato (Lee *et al.*, 1978; Furniss *et al.*, 1977). Por lo tanto, en el caso de una epizootia bacteriana, el efecto de *V. fluvialis* sobre los organismos cultivados es desconocido. Otro *Vibrio* que igualmente deberá ser incluido como bacteria con capacidad ictiopatógena es *V. furnissii*. Esta bacteria al igual que *V. fluvialis*, posee gran semejanza con *A. hydrophila*, diferenciándose de ésta únicamente por el hecho de que se ha reportado como patógena sospechosa, faltando por comprobar experimentalmente su relación etiológica con el hospedero (Brenner *et al.*, 1983).

Las infecciones de origen bacteriano son las causantes de altos índices de mortalidad de peces en cultivo intensivo. Muchas de estas bacterias son habitantes normales de medios acuáticos (Pillay, 1982), que pueden entrar en contacto con el huésped por a carreo en agua de los estanques, asociadas con

partículas tales como sedimento y detritus fecales, por contacto directo o indirecto con otros organismos, o bien, por la presencia de los patógenos en el alimento (Munro, 1981).

Como se dijo anteriormente el poder patógeno de la mayoría de estas bacterias, bacilos Gram (-) de las familias de las Enterobacteriaceae, Aeromonadaceae, Vibrionaceae y Pseudomonadaceae, se ha demostrado ya, inclusive experimentalmente, encontrándose diferentes formas de adaptaciones a la vida parásita, esto es, algunas siendo parásitas estrictos de organismos acuáticos, otras parecen intervenir más como simples comensales del hospedero, planteándose la necesidad de establecer los criterios en virtud de los cuales una bacteria se considera patógeno.

Patógeno o parásito es todo organismo que sea capaz de multiplicarse en un hospedero y causar daño a su hospedador (Madigan *et al.*, 2000). El grado de patogenicidad que es capaz de producir este patógeno depende de su virulencia. Esta virulencia o potencia de sus toxinas es expresada como D₅₀L (dosis media letal), equivalente al número de microbios en una dosis que pueden matar al 50% de los animales experimentales inoculados, en condiciones normales (Tortora *et al.*, 1997).

Para demostrar que un tipo concreto de microorganismos causa una enfermedad específica, se han formulado los llamados postulados de Koch que describen una sucesión secuenciada de eventos científicos, experimentalmente comprobables:

1. El microorganismo debe estar siempre presente en los animales que sufren la enfermedad y no en individuos sanos.
2. El microorganismo debe ser cultivado en cultivo axénico, fuera del cuerpo del animal enfermo.

3. Tal cultivo, cuando se inocular a un animal susceptible, debe iniciar los síntomas y signos característicos de la enfermedad original.
4. El microorganismo inoculado debe ser reaislado experimentalmente y en cultivo axénico, de nuevo en laboratorio, tras lo cual debe mostrar las mismas características.
5. En caso de animales sobrevivientes a la infección, éstos deberán haber creado inmunidad contra los microorganismos inoculado.

La sanidad acuícola adquiere pues una creciente importancia económica que hace necesaria la lucha contra estas enfermedades. La Ictiopatología en su primera etapa, tanto en la práctica como en la investigación, pretende el diagnóstico, la prevención y el control de enfermedades de los organismos, sobre todo de interés comercial (Contreras, 1988; Kinkelin *et al.*, 1985). La prevención proporciona las medidas y acciones tendientes a evitar el ingreso, aparición y dispersión de condicionantes que propicien la enfermedad en las poblaciones de organismos cultivados en las granjas acuícola, así como la eliminación o disminución de condiciones estresantes (Piper, 1982).

De esta manera, la metodología general de intervenir para combatir las enfermedades será reconocer las causas, favorecer la fisiología del animal, interrumpir la transmisión de los bioagresores y destruir el agente patógeno que haya entrado al organismo mediante el uso del control químico adecuado, o bien, potenciando las reacciones de defensa naturales del hospedero (Kinkelin, *et al.*, 1985).

El conjunto de medidas de higiene y mejora genética que se implementen, como forma de intervención zotécnica, propiciará la armonía entre las funciones

fisiológicas de los organismos cultivados y el ambiente, pero el manejo inadecuado del ambiente acuático puede comprometer la salud de los organismos. Así, la calidad física (temperatura, turbiedad y radiaciones) y química del agua (acidez, alcalinidad, gas diluido, sustancias nitrogenadas, tóxicos diversos, pH, oxígeno, dióxido de carbono, dureza, amoníaco y salinidad), deberán mantenerse dentro de sus límites óptimos para cada organismo que se esté cultivando, debiéndose efectuar su monitoreo rutinario.

La práctica adecuada de la nutrición y alimentación de los organismos es de gran importancia para su desarrollo y crecimiento saludable y se debe definir con exactitud para cada fase en proporción con la biomasa. El almacenaje del alimento balanceado será diseñado de tal manera que se evite su deterioro, así también deberá de contar con control de calidad bromatológico y microbiológico, el cual debe ser proporcionado por el proveedor junto con la fecha de caducidad del mismo (Contreras, 1988; Negrete y Romero, 1998a; Piper, 1982).

El registro de información como mortalidad e historial zoonosanitario de cada lote de organismos ingresados a las instalaciones, así como del uso de químicos con fines profilácticos, debe llevarse rutinariamente. El adecuado diseño de las instalaciones, bodega y estanquería para los fines del cultivo propuesto, es decir por el empleo de filtros, ventiladores y bombas que cumplan con las especificaciones requeridas, disminuirá las posibilidades de alterar el equilibrio ambiente-bioagresor-hospedero (Contreras, 1988).

Entre las diferentes medidas adoptadas internacionalmente para disminuir estos riesgos, destaca la certificación de poblaciones e instalaciones acuícolas, principalmente en los lotes destinados a la exportación, la que conjuntamente con la aplicación de cuarentenas y los programas de certificación de la producción e instalaciones acuícolas del país, permitan certificar la ausencia de estas enfermedades y, por consiguiente, evitar su introducción y dispersión (NOM-10-

PESCA-1993, NOM-011-PESCA –1993, PROYECTO-NOM-021-PESCA 1994 y NOM-022-PESCA- 1994).

Para tales fines, en México, a través de la Dirección General de Acuacultura, se han emitido normas, las cuales no se cumplen en los centros acuícolas nacionales. Dada la trascendencia que ha adquirido la certificación de las instalaciones acuícolas, para contar con un permiso sanitario de producción y movilización de este producto, es de gran importancia conocer el estado sanitario actual del centro de producción acuícola nacional.

La práctica más aceptada dentro del grupo de acuicultores para controlar y prevenir infecciones de origen bacteriano, dentro de sus instalaciones, es el suministro de antibióticos y otros químicos de forma rutinaria. El uso rutinario de estas prácticas por parte de los acuicultores, con el objetivo de resolver el problema de enfermedades infecciosas en sus granjas acuícolas, ha resultado en un incremento de la presencia de plásmidos resistentes en diferentes especies de bacterias patógenas de peces (Aoki *et al.*, 1971,1981,1983; Watanave *et al.*,1971; Hayashi *et al.*,1982; Bast *et al.*, 1988; Hedges *et al.*, 1985; Toranzo *et al.*, 1983; Negrete *et al.*, 2003), algunas de ellas también son patógenas para el humano, y que al entrar de alguna forma en contacto con éste, como fuente de alimento o como ornato, puede transmitirle plásmidos y como consecuencia también la resistencia a antibióticos, implicando un problema de salud pública, que puede ser llevado a cabo por conjugación del plásmido de las bacterias portadoras a las bacterias receptoras, patógenas para el humano como *Escherichia coli* (Aoki *et al.*, 1971; Hedges y Datta, 1971; Toranzo *et al.*, 1983).

En *E. coli* se conocen al menos dos toxinas que están codificadas en plásmidos: la hemolisina que lisa los glóbulos rojos, y la enterotoxina que induce secreción masiva de agua y sales al intestino (Madigan *et al.*, 2000). Las hemolisinas son proteínas extracelulares, consideradas factores de virulencia, producidas por

patógenos que contribuyen al establecimiento y mantenimiento de la infección y actúan en la membrana citoplasmática de la célula hospedera, los eritrocitos, provocando su lisis. La virulencia de algunas bacterias patógenas de peces ha sido relacionada con diferentes factores. Toranzo y Barja (1993), relacionan esta capacidad con diferentes características bioquímicas en *V. anguillarum*.

ANTECEDENTES

La acuicultura en México, tradicionalmente ha hecho uso de estrategias de cultivo baratas, pero de baja producción, como la acuicultura extensiva o de repoblación, en donde se introducen crías o larvas en cuerpos de agua naturales o artificiales sin tener control de estas poblaciones, resultando como consecuencia el desarrollo de fuertes pesquerías en presas, la creación de fuentes de trabajo directas o indirectas originadas por estas pesquerías y la obtención de proteína de origen animal para consumo de las poblaciones rurales aledañas por medio de la pesca de subsistencia.

Sin embargo, últimamente el acuarismo ha cobrado fuerte interés como estrategia importante de ingresos económicos, sobre todo en los estados de México y Morelos.

Estos productores, básicamente rurales, están desarrollando esta actividad acuícola en el ámbito de subsistencia, en donde se aprovechan bordos, jagüeyes y otros cuerpos de agua que pueden ser permanentes o temporales, o bien improvisando, en la mayoría de los casos, estanques de cemento, o bien simplemente excavando un hoyo directamente en el suelo, de tal forma que obtienen estanques rústicos para el cultivo de especies exóticas (Kottella, 1993).

La introducción al país de especies exóticas puede traer como consecuencia el incremento significativo en la diversidad de microorganismos patógenos en el ambiente. Diversos estudios han demostrado la prevalencia de patógenos en lotes infectados carentes de signos clínicos, como fue el caso de la infección viral pancreática (IPV) y la enfermedad entérica de la boca-roja (Munro *et al.*, 1982; Phillips *et al.*, 1985), que propagaron el patógeno a otras regiones, al trasladarlo junto con los organismos portadores sanos.

Los diferentes sistemas de producción de especies acuáticas requieren constantemente de ser provistas de organismos en diferentes etapas de desarrollo, que pueden ser surtidos por centros o granjas nacionales o extranjeras, o bien, capturados de ambientes naturales. Esto implica también, por otro lado, alto riesgo de contaminación, diseminación y dispersión de microorganismos patógenos junto con los lotes trasladados.

Se estima que el 10% del bagre cultivado en México se pierde debido a enfermedades infecciosas que pudieron ser previstas (Jiménez y Galaviz, 1986). Infecciones como la septicemia se presentan en el 85% de las piscifactorías del país. En un estudio realizado en Amanalco de Becerra, Estado de México, durante el ciclo de producción 1988, se registró una mortandad del 35% de la producción, sin considerar la mortalidad natural, con pérdidas equivalentes al 20% de la inversión total (comunicación personal del ejidatario).

Estas granjas acuícolas, son empresas cuyo propósito además de cultivar determinadas especies, es evitar las pérdidas económicas, por lo que los acuicultores deben prevenir los ingresos, la dispersión y permanencia de bacterias dentro de sus instalaciones. Para evitarlo y creyendo que la mejor estrategia es la prevención, se han usado y abusado de la aplicación de químicos y antibióticos para el control de las infecciones, los cuales son administrados rutinariamente e incorporados en el alimento balanceado para peces (Davis y Hayasaka, 1983; Hastings y McKay, 1987; Madigan *et al.*, 2000), o directamente administrados dentro de los estanques de cultivo, desconociendo si existe el estado de enfermedad infecciosa, la especie de bacteria que ha infectado la producción, y en el caso de que así sea, el tipo de antibiótico adecuado para destruir la bacteria específica y la dosificación necesaria.

En países como Estados Unidos y algunos europeos, este problemas ha sido ya reportado (Son *et al.*, 1977). En México, algunos grupos de piscicultores (Negrete

y Romero, 1998) cuyo primer y más importante ingreso económico proviene de estas pequeñas granjas rústicas, al tratar de prevenir y controlar las enfermedades infecciosas dentro de sus instalaciones, han iniciado el uso desmedido de antibióticos incorporados al alimento balanceado y suministrado rutinariamente a los peces, por tal motivo es importante establecer la sensibilidad o resistencia a los antibióticos, que como resultado de este manejo inadecuado pudieron haber adquirido las bacterias patógenas presentes en la carpa dorada, *Carassius auratus*, así como detectar si esta práctica acuícola ha generado plásmidos resistentes a antibióticos de uso acuícola, y por último establecer la capacidad de las bacterias portadoras de plásmidos-R, de transmitirlos por conjugación a cepas receptoras de *Escherichia coli*.

Existe abundante evidencia circunstancial consistente con el hecho de la transferencia de genes intermicrobial (horizontal y vertical) en la naturaleza. Con respecto al mecanismo de transferencia se considera que generalmente operan uno o varios de los siguientes mecanismos: conjugación, transducción y transformación (Davis, 1990).

Trier-Cuot *et al.*, (1978), construyeron experimentalmente un puente para la conjugación de plásmidos. Encontraron transferencia conjugativa de *E. coli* a *E. faecalis*, *S. lactis*, *S. agalactiae*, *B. thuringiensis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *B. sphaericus*, lo que confirma la transferencia de plásmidos entre bacterias gram negativas y positivas.

Lo que es más se ha demostrado transferencia de plásmidos entre bacterias y células vegetales y entre bacterias y hongos (Madigan *et al.*, 2000).

Crosa *et al.* (1987; 1980), han demostrado que la virulencia en *Vibrio anguillarum* está relacionada con la presencia de plásmidos de peso molecular de 47×10^6 pares de bases (pb). La mayoría de los plásmidos son moléculas de ADN de doble

cadena circulares covalentemente cerrados (Tortora *et al.*, 1977). Varían de longitud desde unos pocos hasta miles de pares de bases, contiene genes que son esenciales para el mantenimiento de sus funciones, tales como la iniciación y control de la replicación. Muchos plásmidos contienen genes que son de utilidad no sólo para ellos mismos, algunos lo son también para su hospedero, por ejemplo están los genes que controlan la resistencia a antibióticos, los que degradan componentes y los que codifican para factores de virulencia.

Estos tipos de genes están frecuentemente localizados junto con transposones y esto ha creado una gran cantidad de variaciones y flexibilidad en la constitución de los plásmidos. La identificación y clasificación de los plásmidos es de especial importancia en medicina, porque este tipo de genes, como de resistencia a antibióticos y factores de virulencia, están frecuentemente presentes en los plásmidos. El reconocimiento de este tipo de plásmidos presentes en un patógeno puede ser un instrumento de gran importancia en el seguimiento de la diseminación de una infección y puede también ser útil para establecer el diagnóstico. Además de estos usos prácticos, hay otras aplicaciones más básicas como es el seguimiento de relaciones genéticas y origen evolutivo (Conte, 1995).

En las últimas dos décadas, considerando, únicamente la bacteria *V. anguillarum*, se han aislado 267 serotipos O1, de infecciones de peces, alrededor de todo el mundo. De éstas, 260 fueron portadores de plásmidos de virulencia, todos ellos similares o idénticos al plásmidos pJM1 (Singer *et al.*, 1992). La virulencia de estos serotipos de *V. anguillarum* está siempre cercana a la presencia de plásmidos parecidos o idénticos al plásmido de 65-70 kb pJM1 de virulencia, que codifican un sistema de alta afinidad con el sistema de incorporación rápida de hierro (Olsen y Larsen 1990; Wiik *et al.*, 1989; Tolmashy *et al.*, 1988 ; Crosa *et al.*, 1977).

El plásmido asociado con factores de virulencia ha sido identificado en *V.*

anguillarum y las células que contienen estos plásmidos pueden crecer en presencia de hierro, aportando la proteína transferrina a concentraciones que no permitirían el crecimiento de la bacteria libre del plásmido. En suma, se ha demostrado que la expulsión del plásmido provoca una drástica reducción de la virulencia de los organismos (Crosa, 1980).

Sobre la base de la aparente presencia de ADN extracromosómico en *Vibrio salmonicida*, y al hecho de que los plásmidos son esenciales para la expresión de la virulencia de *V. anguillarum* (Valla *et al.*, 1992); se puede suponer que un plásmido sea esencial también para la expresión de la virulencia en otras especies del mismo género como *Vibrio fluvialis* y *Vibrio furnissii*.

PLANTEAMIENTO DE PROBLEMAS

1. En muestras de riñón de peces *Cyprinus carpio* se han aislado sistemáticamente bacterias identificadas como *A. hydrophila* con posibilidad de ser *Vibrio fluvialis*, por lo que existe imprecisión en la identificación de estas cepas, así como de las técnicas empleadas hasta el momento.
2. En todas las granjas acuícolas previamente estudiadas, se han aislado diferentes especies de bacterias, de las cuales se desconoce si existe una relación etiológica con el hospedero (Negrete y Romero, 1998a).
3. No existe una técnica rápida, certera y confiable para identificar bacterias que procedan de muestras aisladas de organismos acuáticos.
4. Con el objetivo de resolver el problema de enfermedades infecciosas en las granjas acuícolas, los acuicultores están abusando del control químico, lo que puede estar generando plásmidos resistentes en bacterias patógenas de peces y de algunas patógenas para el humano también, y que al entrar de alguna forma en contacto con éste, como fuente de alimento o como ornato, puede transmitirle plásmidos y como consecuencia la resistencia a antibióticos, implicando un problema de salud pública.

JUSTIFICACIÓN

La sanidad acuícola está adquiriendo gran importancia económica, por lo que se requiere de la implementación de técnicas apropiadas que apoyen las investigaciones para generar conocimientos en apoyo a la solución de las enfermedades infecciosas en estos sistemas.

La identificación rápida, exacta y confiable del agente causal de la infección mediante el uso de técnicas modernas de identificación usadas en el análisis clínico, podrán hacer posible el correcto y oportuno diagnóstico. Así mismo, debido a la cercanía de los perfiles bioquímicos entre las diferentes especies y subespecies de las principales bacterias patógenas de organismos acuáticos, como *Aeromonadaceae* y *Vibrionaceae*, se dificulta la diferenciación entre estos grupos de bacterias. En consecuencia la implementación de técnicas moleculares para la definición exacta de las especies de estos patógenos se plantea como la solución al problema.

Al registrarse en desequilibrio la relación hospedero-patógeno-ambiente, en granjas acuícolas estudiadas previamente, en donde se aislaron bacterias cuya capacidad de provocar infección en los cultivos es aún desconocida (Negrete y Romero, 1998b), es necesario definir si las cepas aisladas son realmente patógenas y en ese caso el grado de patogenicidad o virulencia de las mismas, entendiéndose como tal, la capacidad para provocar infección en organismos susceptibles sanos.

Los grupos de piscicultores estudiados (Negrete y Romero, 1998a) cuyo primer y más importante ingreso económico proviene de estas pequeñas granjas rústicas, al tratar de prevenir y controlar las enfermedades infecciosas dentro de sus instalaciones, han hecho uso desmedido de antibióticos, incorporados a alimento

balanceado suministrado rutinariamente a los peces y como resultado de este manejo inadecuado se requiere detectar si esta práctica acuícola ha generado plásmidos resistentes a antibióticos de uso acuícola.

HIPOTESIS DE TRABAJO

Si las cepas bacterianas aisladas de la carpa dorada, *Carassius auratus*, pertenecen a las especies de *Aeromonas hydrophila* o *Vibrio fluvialis*; **entonces**, al aplicar técnicas identificación a nivel bioquímico (API-20E y API-20NE) y moleculares (PCR) ambas especies quedarán diferencialmente establecidas.

Si *Vibrio fluvialis* y *Vibrio furnissii* tienen la capacidad de provocar infecciones en organismos acuáticos, **entonces**, al inocular experimentalmente estas bacterias en carpa dorada, *C. auratus*, en organismos sanos y susceptibles, se cumplirán los postulados de Koch.

Si las cepas bacterianas aisladas de *C. auratus* infectados, han recibido una dosis excesiva de antibióticos de uso común en acuicultura como cloranfenicol, kanamicina o tetraciclina, **entonces**, al extraer el ADN plasmídico de cepas bacterianas aisladas de estos individuos, tratados terapéuticamente de una forma rutinaria con los antibióticos mencionados se obtendrán plásmidos-R.

Si la virulencia en *Vibrio fluvialis* y *Vibrio furnissii* está relacionada con los plásmidos, **entonces**, después de curar los plásmidos que portan, las cepas perderán su capacidad hemolítica al ser cultivadas en placas con agar sangre.

MATERIAL Y MÉTODOS

Prospección sanitaria de granjas y selección de la zona de muestreo.

Durante el año de 2000 se efectuó la prospección sanitaria en cinco granjas piscícolas en el estado de Morelos, en donde se cultiva el pez dorado, *C. auratus*, sobre todo en aquellos sitios donde se manifestaron signos y lesiones de infección bacteriana. Las granjas estudiadas fueron seleccionadas al azar.

Con el objeto de encontrar el patógeno de interés y para recabar la información sobre las condiciones sanitarias del manejo de las granjas se aplicó una guía de observaciones. Ésta contempló 48 variables que definen las condiciones de manejo de una granja acuícola desde la perspectiva de la Sanidad Acuícola, para lo cual se siguieron los criterios Piper (1992), Negrete y Romero (1998a) y las Normas Mexicanas de Pesca que aplican para cuarentena, movilización, alimento y puntos críticos a seguir por centros y granjas acuícolas (NOM-011-PESCA-1994, PROYECTO NOM-020-PESCA-1994, PROYECTO NOM-021-PESCA-1994 y PROYECTO NOM-022-PESCA-1994).

Se asignó un puntaje a cada uno de las variables agrupadas en los diferentes aspectos sanitarios a considerar.

Durante el mismo día, se efectuó además, la toma de muestras de agua de los estanques y del canal de agua que surte a una de ellas, del alimento balanceado y vivo que se les proporciona a los peces en cultivo y del riñón de los peces que manifestaron signos de infección (Munro *et al.*, 1982; Austin y Austin, 1987). Se tomaron muestras de diez estanques en forma aleatoria.

Toma de muestras.**Determinación cuantitativa.***Selección de los ejemplares.*

Se extrajeron treinta peces de *C. auratus* en estadio juvenil de los estanques de cultivo, mediante una red de cuchara, todos aún vivos y manifestando signos y lesiones generales de infección, como nado irregular, boqueo en la superficie de los estanques de cultivo, aletas deshinchadas y sanguinolentas, sin escamas o con escamas erizadas y puntos hemorrágicos sobre la superficie del cuerpo. Se colocaron en una tina con agua y se anestesiaron con sulfometano de tricaina (0.1 g/L), se desinfectó con alcohol la superficie del cuerpo de cada uno de los peces, después de ser practicada la eutanasia, se efectuaron las disecciones haciendo un corte por arriba de la línea lateral y a lo largo del cuerpo, desde el opérculo y hasta el ano exponiendo de tal manera el riñón (Munro, 1980; Michael, 1982).

Las muestras de riñón de los peces se tomaron *in situ*, en condiciones estériles para lo cual se delimitó el campo de trabajo con dos mecheros, se sembró con el hisopo y éste se introdujo en la cubeta del estuche comercial con amortiguador fosfato estéril (Swabs test kits) Millipore BedFor Mass (APHA, *et al.*, 1992).

Las muestras de agua se tomaron del canal que abastece a una de las granjas y de todos y de cada uno de los estanques de todas las granjas estudiadas. A 0.50 cm de profundidad de la superficie se introdujeron bolsas estériles de plástico Millipore BedFor Mass. con una pastilla de tiosulfato de sodio, y cerradas, se introdujeron a los estanques y se tomaron 100 ml de agua, sin permitir la entrada de burbujas de aire y se cerraron dentro de los estanques (APHA *et al.*, 1992). Se tomaron para el conteo de bacteria muestras con Total-Count (para el conteo de bacterias totales) y Coli-Count (para conteo de Coliformes totales y Coliformes

fecales) Millipore BedFor Mass. Estos se mantuvieron sumergidos dentro del agua durante 30 segundos, se sacudieron para eliminar el agua en exceso, el muestreador se introdujo hasta el tope del estuche. Se incubaron en una incubadora Millipore, los primeros a 35.5 °C y los segundos a 44.5 °C durante 24 h.

Las muestras de alimento balanceado en formas de pienso y hojuelas, y las de alimento vivo (*Artemia franciscana* y *Tubifex sp.*) se obtuvieron directamente de los empaques originales (en los que surte el proveedor) y de los contenedores y se introdujeron en bolsas estériles de plástico Millipore BedFor Mass (APHA, *et al.*, 1992). Una vez que se tomaron todas las muestras, éstas se trasladaron refrigeradas, al Laboratorio de Microbiología de la UAM-Xochimilco para ser procesadas.

Procesamiento de las muestras.

Las muestras de agua se diluyeron a la centésima, disolviendo 1 mL de las muestras en 99 mL de agua estéril y solución amortiguadora de fosfato (APHA, *et al.*, 1992), se sembró 0.1 mL de las diluciones y en placas con medios Agar-tiosulfato- citrato-sales biliares-sacarosa (TCBS) e Infusión Cerebro Corazón (BHI), se esparció con una varilla de vidrio acodada previamente esterilizada y se incubó durante 24 h a temperatura ambiente.

Para los muestreadores Total-Count la incubación se efectuó a 35 °C durante 24 hrs. Para los Coli-Count a 35 °C durante 18-24 h, los Coliformes Totales 44.5 °C durante 18-24 h y los Coliformes Fecales. Por último se efectuó el conteo.

Se disolvió 1 g de alimento en 99 mL de agua estéril con solución amortiguadora de fosfato esterilizado (APHA *et al.*, 1992). Se efectuó el mismo procedimiento que se detalló anteriormente y se efectuaron diluciones hasta la potencia 10^{-6} .

Para las muestras del riñón de organismos se tomó 0.1 mL de Swabs test kits Millipore, BedFor, Mass., se efectuó el mismo procedimiento que a las demás muestras, diluyéndose en esta ocasión a la centésima y hasta la cuarta dilución. Una vez obtenido el crecimiento de las colonias a las 24 h, se procedió al conteo de las mismas.

Preparación de Muestras para conteo con Microscopio de Epifluorescencia.

Las muestras de agua, alimento, organismo y el blanco, se fijaron en una solución de amortiguador de fosfato y glutaraldehído 4% (100 mL). Se agregó 0.5 mL de naranja de acridina, se agitó vigorosamente y se dejó reposar 10 min.

En la columna de filtración se colocó un pre-filtro de acetato de celulosa, posteriormente el filtro de nucleopore de policarbonato, agregándose 10 mL de la muestra ya teñida con naranja de acridina y se aplicó el vacío con ayuda del equipo Millipore de filtración manual, se retiró la columna de filtración, la membrana se colocó en un porta-objeto, se añadió una gota de aceite de inmersión y posteriormente se colocó el cubre-objeto. Se efectuó el conteo de las bacterias en el microscopio de Epifluorescencia (30 campos) (Coleman, 1980).

Preparación de Muestras para Microscopio Electrónico de Barrido.

Después de ser fijadas las muestras y el blanco testigo, las bacterias se recuperaron por filtración en vacío, en filtros de nucleopore de policarbonato de 47 mm de diámetro (poro de 0.2 μm) cada filtro se deshidrató en batería de alcoholes (50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 100%) por 20 min, finalmente por acetona al 100% y se refrigeraron. Se secaron a punto crítico con CO_2 se evaporaron con oro en la ionizadora JOEL/JFC 1100. Posteriormente se montaron en porta muestras y se observaron en Microscopio Electrónico de Barrido JSM 35 (Zimmermann, 1977).

Determinación cualitativa.

Procesamiento de las muestras.

Al mismo tiempo que se efectuó la toma de muestras de agua, alimento y riñón para la cuantificación de la presencia de bacterias en estas muestras se efectuó el siguiente procedimiento para su identificación. Las muestras del riñón de los peces se extrajeron con una asa bacteriológica estéril, se sembraron en tubos con agua peptonada alcalina (pH9) y se incubaron a 20 °C durante 24 h. Posteriormente, fueron sembradas en placas de TCBS y de BHI, y se volvieron a incubar a temperatura ambiente durante 24 h. Para el análisis de las muestras de agua y de alimento, de las placas de TCBS y BHI en donde se efectuó el conteo en placa (procedimiento anterior) se extrajeron al azar las colonias y se resembraron en placas con agar de BHI.

Identificación con API-20E Y API-20NE y pruebas complementarias.

Las colonias obtenidas fueron sometidas al proceso de purificación, por medio de resiembras sucesivas en placas agar del mismo medio de cultivo, una vez obtenida homogeneidad en la morfología celular se efectuó la tinción de Gram. Finalmente las cepas Gram (-) fueron identificadas usando las galerías comerciales API-20E y API-20NE (Analytical Profile Index, 1999; 1989) y pruebas bioquímicas complementarias siguiendo los criterios de: Dalsgaard *et al.*(1998) Altewegg *et al.*(1990), Colwell (1984); Lee *et al.*(1981), Furniss *et al.*(1977), Cowan (1974), Brenner *et al.* (1983) y Holt *et al.* (1994). Con los perfiles bioquímicos de las identificaciones obtenidas de esta forma, se efectuó un análisis de similitud, con el objeto de seleccionar la mejor identificación, para lo cual se aplicó el Índice de Jaccard (Sokal, 1965); comparando el perfil bioquímico obtenido para cada cepa, con los perfiles teóricos propuestos por las bases de datos de ambos API y de las pruebas complementarias efectuadas.

RESULTADOS

Prospección de las granjas.

Los resultados de la aplicación de la guía de observaciones y la encuesta realizada en las cinco granjas piscícolas del Estado de Morelos, donde en ese momento se practicaba el cultivo de la carpa dorada, *C. auratus* se presenta en la Tabla 9, donde se señalan los puntos críticos del manejo de las granjas.

Tabla 9. Puntos críticos del manejo de granjas acuícolas productoras de pez dorado, *C. auratus*, en el Estado de Morelos.

PUNTOS CRÍTICOS	Puntaje máximo	Granja 1	Granja 2	Granja 3	Granja 4	Granja 5
INFRAESTRUCTURA	3	1.5	1.5	0	3	3
Laboratorio	1	-	-	-	+	+
Oficinas	0.5	-	-	-	+	+
Cerca protectora	1.5	+	+	-	+	+
CONDICIONES DE BODEGA	12	0	4	2	2	12
Ventilación adecuada	2	-	-	+	-	+
Libre de humedad	2	-	+	-	-	+
Aislada de contaminantes	2	-	+	-	-	+
Sobre tarima	2	-	-	-	-	+
Libre de fauna nociva	2	-	-	-	-	+
Forma de empaque	1	-	-	-	+	+
Fecha de caducidad	1	-	-	-	-	+
SERVICIOS	5	5	5	4.5	3.5	5
Agua	3	+	+	+	+	+
Drenaje	0.5	+	+	+	-	+
Servicios eléctricos	1	+	+	+	-	+
Servicio sanitarios	0.5	+	+	-	+	+
ESTANQUERÍA	14	5	5	2	14	8
Apropiada para la especie	2	+	+	+	+	+
Sistema de aeración	3	-	-	-	+	+
Temperatura adecuada	3	-	-	-	+	-
Filtros	3	+	+	-	+	-
Suministro de agua independiente	3	-	-	-	+	+
LIMPIEZA E HIGIENE	22	12	7	0	0	15
Lavado de equipo en Gral.	2	+	+	-	-	+
Desinfección de estanques	3	+	+	-	-	+
Estanques para cuarentena	5	-	-	-	-	-

Tabla 16. Índice de Jaccard aplicado a las cepas bacterianas aisladas de las muestras agua, alimento, y peces.

IDENTIFICACIÓN API-20E	IDENTIFICACIÓN API-20NE	COEFICIENTE DE JACCARD									AMBIENTE				
		A	P	1	-	2	0	E	A	P		1	-	2	0
<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>	0.69	0.74	0.9	0.56	0.5	0.76	0.66	0.39						pez
<i>Pseudomonas</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>	0.74	0.82	0.65	0.82	0.31	0.61	1	0.43						pez
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	0.78	0.82	0.75	0.82										agua
<i>A. salmonicida</i>	<i>A. sal. masou. achrom.</i>	0.82	0.74	0.8	0.86	0.46	0.71	0.9	0.34	0.88					agua
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	0.52	0.52	0.8	0.56	0.58	0.71	0.61	0.6						agua
<i>A. hydrophila / V. fluvialis</i>	<i>A. hydrophila / V. fluvialis</i>	0.73	0.65	0.55	0.73	0.77	0.61	0.66	0.65	0.92					agua
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>	0.64	0.73	0.65	0.56	0.68	0.78	0.66	0.62	0.92					agua
<i>Vibrio fluvialis</i>	<i>Vibrio fluvialis</i>	0.69	0.69	0.68	0.78		0.71			0.92					agua
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	0.78	0.78	0.7	0.78	0.68		0.61	0.34	0.88					alimento
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>A. hydrophila / V. fluvialis</i>	0.65	0.73	0.8	0.82	0.87	0.7	0.42	0.78	0.96					alimento
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	0.56	0.56	0.8	0.68	0.8	0.52	0.47	0.73						agua
<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Aeromonas sal. salmonicida</i>	0.78	0.73	0.7	0.78	0.81	0.76	0.66	0.82	0.96					agua
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	0.6	0.52	0.85	0.78	0.9	0.87	0.38	0.82	0.96					pez
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	0.69	0.56	0.9	0.78	0.72	0.72	0.43	0.73						pez
<i>A. hydrophila / V. fluvialis</i>	<i>A. hydrophila / V. fluvialis</i>	0.62	0.82	0.65	0.73	0.95		0.52	0.82	0.96					agua
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	0.96	0.82	0.7	0.96		0.76			0.92					pez
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>A. hydrophila / V. fluvialis</i>	0.69	0.78	0.85	0.86	0.82		0.5	0.78	0.96					pez
<i>A. hydrophila / V. fluvialis</i>	<i>A. hydrophila / V. fluvialis</i>	0.87	0.87	0.8	0.91	0.77	0.71	0.49	0.68	0.92					pez
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>A. hydrophila/cavatae/V. fluvialis</i>	0.82	0.82	0.75	0.73	0.9	0.76	0.54	0.91	0.88					pez
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	0.91	0.82	0.75	0.95	0.9	0.66	0.52	0.82	1					agua
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	0.68	0.43	0.75	0.56	0.55	0.63	0.55	0.48	0.92					agua
<i>A. hydrophila/V. cholerae</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	0.82	0.75	0.82	0.91	0.81	0.77	0.72	0.78	0.92					pez
<i>A. hydrophila/V. fluvialis</i>	<i>A. hydrophila / A. sobria</i>	0.73	0.78	0.85	0.91	0.95	0.77	0.39	0.95	0.92					pez
<i>A. hydrophila / V. fluvialis</i>	<i>A. hydrophila/cavatae/sobria</i>	0.73	0.91	0.65	0.82	0.9	0.65	0.23	0.78	0.84					pez
No identificada	<i>A. hydrophila/cavatae/V. fluvialis</i>				0.86	0.76	0.42	0.69							pez
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.65	0.62	0.85	0.73	0.73	0.61	0.42	0.65						pez
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.65	0.62	0.85	0.73	0.72	0.73	0.42	0.72						pez
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.65	0.62	0.85	0.73	0.72	0.61	0.42	0.65						pez
<i>A. hydrophila / V. fluvialis</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	0.82	0.77	0.6	0.77	0.61	0.68	0.72	0.38	0.96					pez

<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	0.82	0.62	0.85	0.73	0.65	0.6	0.66	0.62	agua
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas cepaciae</i>	0.65	0.65	0.85	0.73	0.65	0.61	0.66	0.62	agua
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.65	0.65	0.85	0.73	0.65	0.61	0.66	0.62	agua
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>A. hydrophila /caviae/fluviatis</i>	0.6	0.6	0.85	0.78	0.86	0.68	0.72	0.38	pez
<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Aeromonas sal. salmonicida</i>	0.56	0.78	0.9	0.6	0.81	0.85	0.52	0.78	pez
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>A. hydrophila/V. fluviatis</i>	0.56	0.65	0.9	0.73	0.31	0.66	0.38	0.76	pez
No identificada	No identificada									pez
No identificada	<i>A. hydrophila/caviae/fluviatis</i>					0.9	0.55	0.55	0.82	pez
<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>A. salmonicida/masou/achro</i>	0.56	0.43	0.9	0.76	0.4	0.75	0.7	0.43	pez
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas cepaciae</i>	0.82	0.77	0.8	0.73	0.72	0.61	0.42	0.72	pez
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas diminuta</i>	0.82	0.77	0.6	0.73	0.34	0.57	0.42	0.28	pez
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas diminuta</i>	0.56	0.43	0.6	0.73	0.65	0.57	0.47	0.69	pez
<i>A. hydrophila /V. fluviatis</i>	<i>A. hydrophila/caviae/V. fluviatis</i>	0.6	0.68	0.85	0.6	0.87	0.76	0.4	0.78	pez
<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>A. salmonicida/masou/achro.</i>	0.48	0.6	0.95	0.68	0.82	0.71	0.88	0.85	pez
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas cepaciae</i>	0.65	0.65	0.85	0.73	0.68	0.66	0.42	0.6	agua
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.65	0.65	0.85	0.73	0.68	0.66	0.42	0.6	agua
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	0.68	0.65	0.65	0.73	0.5	0.78	0.76	0.76	pez
<i>Shewanella putrefaciens</i>	<i>Shewanella putrefaciens</i>	0.68	0.65	0.65	0.73	0.5	0.76	0.76	0.52	pez
<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i>	0.68	0.73	0.78	0.7	0.68	0.66	0.52	0.78	pez
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>A. hydrophila/caviae/V. fluviatis</i>	0.6	0.65	0.85	0.73	0.86	0.8	0.42	0.87	agua
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>A. hydrophila/caviae/V. fluviatis</i>	0.65	0.55	0.9	0.6	0.81	0.8	0.59	0.6	alimento
<i>A. hydrophila /V. fluviatis</i>	<i>A. hydrophila / caviae</i>	0.6	0.82	0.9	0.65	0.9	0.76	0.52	0.91	agua
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>A. hydrophila /caviae</i>	0.6	0.57	0.85	0.73	0.95	0.71	0.39	0.86	agua
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>A. hydrophila / caviae</i>	0.57	0.6	0.87	0.78	0.86	0.71	0.38	0.87	pez
<i>Aeromonas hydrophila</i>	No identificada	0.65	0.56	0.95	0.71					pez
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas cepaciae</i>	0.6	0.47	1	0.69	0.66	0.8	0.57	0.73	agua
<i>Serratia plymuthica</i>	No identificada	0.69	0.6	0.8	0.78					pez
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas cepaciae</i>	0.52	0.52	0.8	0.62	0.72	0.66	0.47	0.69	pez
<i>A. hydrophila / V. fluviatis</i>	<i>A. hydrophila / caviae</i>	0.82	0.76	0.85	0.82	0.82	0.76	0.52	0.52	agua
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas cepaciae</i>	0.65	0.52	0.9	0.62	0.81	0.61	0.28	0.73	pez
<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>A. salmonicida/masou/achro.</i>	0.73	0.65	0.8	0.73	0.64	0.8	0.72	0.6	pez
<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>	0.6	0.6	0.85	0.69	0.63	0.57	0.41	0.47	agua
<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Aeromonas sobria</i>	0.68	0.6	1	0.82	0.66	0.72	1	0.48	agua
<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>	0.82	0.65	0.95	0.82	0.4	0.57	0.76	0.39	agua

RESULTADOS

<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>A. hydrophila /caviae</i>	.63/.73	.73/.68	.90/.95	.78/.82	.72/.91	.57/.66	.28/.33	.69/.73	0.96	pez
<i>A. hydrophila / V. fluvialis</i>	<i>A. hydrophila/caviae/V. fluvialis</i>	0.86	0.68	0.5	0.65	0.86	0.66	0.47	0.86	0.96	pez
<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>A. salmonicid/masou/bctro.</i>	0.73	0.56	0.95	0.78	0.3	0.66	0.95	0.3		pez
<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i>	0.52	0.6	0.34	0.48	0.77	0.57	0.23	0.69		pez
<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>A. salmonicida salmonicida</i>	0.78	0.62	1	0.73	0.54	0.9	0.76	0.47	0.8	pez
<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>	0.76	0.56	1	0.82	0.86	0.71	0.73	0.86	0.84	pez
<i>A. hydrophila / V. vitreum</i>	<i>A. hydrophila / Vibrio fluvialis</i>	0.82	0.62	0.9	0.63	0.9	0.61	0.42	0.86	0.84	agua
<i>Pseudomonas</i>	<i>Ps. vesicularis/A. salmonicida</i>	0.56	0.47	0.9	0.62	0.54	0.66	0.85	0.39		agua
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>A. hydrophila/caviae/V. fluvialis</i>	0.86	0.69	0.85	0.86	0.91	0.71	0.3	0.82	0.92	agua
<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i>	0.34	0.6	0.39	0.43	0.68	0.52	0.76	0.3		pez
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	0.69	0.6	0.85	0.82	0.81	0.57	0.76	0.3		pez
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	0.78	0.73	0.8	0.73	0.68	0.8	0.52	0.52	0.92	agua
<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>A. salmonicida/masou/bctro.</i>	0.53	0.53	0.85	0.65	0.8	0.52	0.86	0.3	0.84	pez
<i>A. hydrophila / V. fluvialis</i>	<i>A. hydrophila/caviae/V. fluvialis</i>	0.78	0.82	0.85	0.86	0.86	0.71	0.6	0.82	0.92	pez
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.69	0.6	0.85	0.69	0.69	0.71	0.66	0.56		pez
<i>A. hydrophila / V. fluvialis</i>	<i>A. hydrophila/caviae/V. fluvialis</i>	0.78	0.86	0.75	0.86	0.95	0.71	0.38	0.82	0.94	pez
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas vesicularis</i>	0.65	0.69	0.9	0.62	0.31	0.57	0.85	0.26		pez
<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>	0.24	0.24	1	0.73	0.26	0.23	0.9	0.56		pez
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas sobria</i>	0.52	0.52	0.95	0.69	0.81	0.8	0.42	1		pez
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas cepaciae</i>	0.52	0.6	0.5	0.42	0.72	0.57	0.47	0.75		pez
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas cepaciae</i>	0.56	0.55	0.55	0.65	0.63	0.57	0.38	0.6		pez
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>A. hydrophila/caviae/V. fluvialis</i>	0.69	0.82	0.85	0.82	0.9	0.76	0.32	0.82	0.94	pez
<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>	0.73	0.73	0.9	0.73	0.85	0.81	0.51	0.78	0.96	pez
<i>No identificada</i>	<i>Shewanella putrefasciens</i>					0.45	0.8	0.66	0.43		pez
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomona stutzeri</i>	0.39	0.67	0.91	0.78	0.55	0.76	0.71	0.56		pez
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas cepaciae</i>	0.69	0.6	0.6	0.56	0.46	0.57	0.61	0.43		alimento
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas cepaciae</i>	0.6	0.6	0.63	0.6	0.68	0.66	0.38	0.65		pez
<i>A. hydrophila / V. fluvialis</i>	<i>A. hydrophila/caviae/V. fluvialis</i>	0.6	0.56	1	0.65	0.9	0.8	0.42	0.47	0.88	alimento
<i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>Enterobacter agglomerans</i>	0.47	0.52	0.56	0.52	0.63	0.66	0.42	0.78		agua
<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>A. salmonicida/masou/bctro.</i>	0.6	0.6	0.9	0.89	0.36	0.71	0.9	0.34		pez
<i>No identificada</i>	<i>Listonella dermatella</i>				0.36	0.43	0.66	0.8	0.43		pez
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>A. hydrophila/caviae/V. fluvialis</i>	0.65	0.56	1	0.73	0.78	0.76	0.52	0.82	0.92	alimento
<i>A. hydrophila / V. fluvialis</i>	<i>A. hydrophila/caviae/V. fluvialis</i>	0.56	0.91	0.85	0.82	0.9	0.71	0.38	0.82	0.92	alimento
<i>A. hydrophila / V. fluvialis</i>	<i>A. hydrophila/caviae/V. fluvialis</i>	0.56	0.91	0.85	0.82	0.91	0.76	0.38	0.82	0.96	alimento

RESULTADOS

<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>A. salmonicida/masou/achro</i>	0.6	0.6	0.9	0.69	0.4	0.66	0.9	0.39	alimento	
No identificada	<i>Listonella danseella</i>	0.56	0.73	0.65	0.76	0.63	0.61	0.61	0.52	alimento	
No identificada	<i>Pseudomonas</i>	0.65	0.65	0.9	0.69	0.9	0.7	0.38	0.86	alimento	
<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>					0.66	0.66	0.42	0.85	1	alimento
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>A. hydrophila/caviae/V./fluvialis</i>	0.73	0.65	0.96	0.82	0.81	0.8	0.9	0.69	0.96	agua
No identificada	<i>Listonella danseella</i>					0.18	0.52	0.7	0.26	0.92	alimento
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>A. hydrophila/caviae/V./fluvialis</i>					0.86	0.87	0.47	0.82	0.84	alimento
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	<i>Pseudomonas dinitrita</i>	0.59	0.6	1	0.7	0.48	0.66	0.71	0.47		alimento
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.6	0.62	0.9	0.73	0.77	0.76	0.47	0.69		alimento
<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>	0.91	0.56	0.9	0.52					0.84	alimento
<i>Pseudomonas</i>	<i>Adinetobacter twortii</i>	0.65	0.56	0.9	0.72	0.22	0.42	0.85	0.3		alimento
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas mesophilica</i>	0.65	0.56	0.9	0.78	0.31	0.57	0.71	0.3		alimento
<i>A hydrophila /V fluvialis</i>	<i>A. hydrophila/caviae/V./fluvialis</i>	0.78	0.82	0.85	0.86	0.95	0.85	0.47	0.82	0.92	agua
<i>Ahydrophila / V fluvialis</i>	<i>A. hydrophila/caviae/V./fluvialis</i>	0.78	0.82	0.85	0.91	0.61	0.8	0.47	0.82	0.92	agua
<i>A. hydrophila / V. fluvialis</i>	<i>A. hydrophila/caviae/V./fluvialis</i>	0.78	0.82	0.85	0.91	0.85	0.8	0.33	0.78	0.92	agua
<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>A. salmonicida sal/masou/achro</i>	0.65	0.56	0.9	0.73	0.4	0.71	0.83	0.39	0.84	agua
<i>A. hydrophila/ V. fluvialis</i>	<i>A. hydrophila/caviae/V./fluvialis</i>	0.73	0.82	0.85	0.91	0.9	0.78	0.38	0.39	1	agua
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	0.65	0.56	0.1	0.73	0.5	0.76	0.66	0.6		agua
<i>A. hydrophila /V. fluvialis</i>	<i>A. hydrophila/caviae/V./fluvialis</i>	0.73	0.82	0.85	0.91	0.9	0.76	0.47	0.78	0.84	alimento
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.65	0.56	0.1	0.73	0.4	0.66	0.8	0.47	0.92	pez
No identificada	<i>Vibrio vulnificus</i>					0.5	0.47	0.76	0.52		agua
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.65	0.56	1	0.73	0.63	0.76	0.61	0.69		agua
No identificada	<i>A. hydrophila/caviae/V./fluvialis</i>					0.86	0.76	0.61	0.92	0.92	alimento
<i>Pseudomonas</i>	<i>Shewanella putrefasciens</i>	0.65	0.56	1	0.73	0.73	0.66	0.52	0.69		alimento
<i>Pseudomonas</i>	<i>Moraxella lacunata</i>	0.65	0.56	1	0.73	0.72	0.76	0.61	0.65	0.88	agua
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas cepedae</i>	0.65	0.56	1	0.73	0.77	0.66	0.47	0.78		agua
<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>A. hydrophila/caviae/V./fluvialis</i>	0.73	0.62	0.92	0.92	0.91	0.66	0.36	0.82	0.92	agua
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas cepedae</i>	0.69	0.6	0.95	0.69	0.72	0.76	0.47	0.71	0.96	agua
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	0.56	0.6	0.8	0.6	0.36	0.66	0.71	0.76	0.92	agua
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas maltophilia</i>	0.61	0.61	1	0.76	0.45	0.65	0.42	0.82		agua
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>										agua
No identificada	<i>Listonella danseella</i>	0.39	0.39	0.85	0.82	0.73	0.85	0.42	0.82	0.88	alimento
No identificada	<i>Haefia elvahi</i>	0.61	0.65	0.7	0.65	0.36	0.52	0.9	0.35		agua
No identificada	<i>Aeromonas sobria</i>	0.91	0.86	0.7	0.78	0.61	0.71	0.42	0.86	0.8	pez

RESULTADOS

A. hydrophila / V. fluvialis	Vibrio cholerae no 01	0.91	0.86	0.65	0.78	0.82	0.71	0.48	0.82	0.88	pez
Vibrio cholerae No 01	Vibrio cholerae no 01	0.74	0.52	0.85	0.76	0.7	0.71	0.33	0.83	0.89	pez
A. hydrophila / V. fluvialis	V. parahaemolyticus/Cholerae	0.74	0.87	0.85	0.87	0.82	0.71	0.42	0.82	0.14	agua
A. hydrophila / V. fluvialis	A. hydrophila/caviseeV. fluvialis	0.68	0.82	0.85	0.87	0.86	0.71	0.47	0.87	0.84	agua
A. hydrophila / V. fluvialis	A. hydrophila/caviseeV. fluvialis	0.87	0.65	0.65	0.87	0.9	0.71	0.42	0.82	0.84	pez
A. hydrophila / V. fluvialis	A. hydrophila/caviseeV. fluvialis	0.87	0.74	0.73	0.87	0.9	0.71	0.42	0.83	0.92	agua
A. hydrophila / V. fluvialis	A. hydrophila/caviseeV. fluvialis	0.87	0.82	0.6	0.82	0.73	0.71	.57	0.74	0.76	pez
Vibrio cholerae no 01	Vibrio cholerae no 01	0.74	0.74	0.5	0.9	0.55	0.52	0.76	0.49	0.96	agua
A. hydrophila / V. fluvialis	A. hydrophila/caviseeV. fluvialis	0.74	0.63	0.73	0.87	0.77	0.71	0.57	0.87	0.88	pez
A. hydrophila / V. fluvialis	A. hydrophila/caviseeV. fluvialis	0.82	0.82	0.5	0.87	0.91	0.71	0.42	0.83	0.92	pez
A. hydrophila / V. fluvialis	A. hydrophila/caviseeV. fluvialis	0.82	0.87	0.73	0.85	0.81	0.76	0.41	0.91	0.92	pez
A. hydrophila / V. fluvialis	A. hydrophila/caviseeV. fluvialis	0.65	0.65	0.56	0.82	0.86	0.71	0.33	0.83	0.92	agua
Pseudomonas	Pseudomonas	0.65	0.65	0.82	0.82	0.72	0.66	0.33	0.65	0.8	pez
A. hydrophila / V. fluvialis	Aeromonas hydrophila	0.87	0.64	0.55	0.74	0.72	0.66	0.47	0.56	0.8	agua
A. hydrophila / V. fluvialis	A. hydrophila/caviseeV. fluvialis	0.91	0.83	0.55	0.74	0.91	0.77	0.33	0.83	0.88	agua
A. hydrophila / V. fluvialis	Aeromonas / Vibrio	0.74	0.72	0.73	0.87	0.81	0.72	0.42	0.74	0.69	pez
A. hydrophila /V.choleraeN	Vibrio cholerae no 01	0.82	0.72	0.56	0.87	0.86	0.68	0.47	0.74	0.84	pez
Aeromonas hydrophila	A. hydrophila/caviseeV. fluvialis	0.52	0.49	0.9	0.74	0.85	0.96	0.47	0.74	0.92	pez
A. hydrophila 35654		1	0.85	0.77	0.74	1	0.47	0.47	0.74	0.81	ATCC
A. cavisee 15468		1	0.85	0.77	0.81	1	0.47	0.47	0.74	0.81	ATCC
V. parahaemolyticus 17802		0.74	0.74	0.6	0.9	0.55	0.51	0.67	0.48	0.81	ATCC
V. alginolyticus 17749		0.74	0.8	0.65	0.87	0.71	0.8	0.82	0.78	0.88	ATCC

- 1 = A. hydrophila 1.
 2 = A. hydrophila 2
 3 = A. salmonicida
 4 = V. fluvialis
 5 = A. cavisee
 6 = A. salmonicida
 7 = A. sai. maseauide/ochromogenes
 8 = A. sobria
 9 = V. fluvialis

Como resultado de las pruebas de bioquímicas complementarias aplicadas a 77 cepas con identificación confusa o imprecisa, se identificaron 30 cepas como *Aeromonas hydrophila*; 16 cepas como *Vibrio fluvialis*, diferenciándose un tercer grupo con 31 cepas, con un perfil diferente a las anteriormente mencionadas, que correspondieron a *Vibrio furnissii* (Tabla 17, 18 y 19).

Tabla 17. Reacciones bioquímicas de *V. furnissii* (ATCC35016), *V. fluvialis* (NCTC 11327), *A. hydrophila* (ATCC 35654) y cepas silvestres, aisladas de agua, alimento y del riñón de *C. auratus*.

Bioquímica	Reacción para <i>V. furnissii</i>		Reacción para <i>V. fluvialis</i>		Reacción para <i>A. hydrophila</i>	
	ATCC*	silvestres%	ATCC*	silvestres%	ATCC*	silvestres%
Indol	(-) 11	(-)	(-) 13	(-)	(+) 85	(+)
Rojo de metilo	(+) 100	(+)	(+) 96	(+)	(+)	(+)
Voges-Proskauer	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)	(+) 80	v
Citrato-Simmons	(+) 100	(+)	(+) 93	(+)	(+) 85	(+)
H ₂ S en agar de hierro triple azúcar	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)	(-) 80	(-)
Urea hidrólisis	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)
Fenilalanina	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)
Lisina (Moller)	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)	(-) v	(-)
Arginina (Moller)	(+) 100	(+)	(+) 93	(+)	(+) 97	(+)
Ornitina (Moller)	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)
Movilidad	(+) 89	(+)	(+) 70	(+)	(+) 100	(+)
Hidrólisis de gelatina	(+) 86	(+)	(+) 85	(+)	(+) 97	(+)
Utilización de malonato	(-) 11	(-)	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)
Gas a partir de glucosa	(+) 100	(+) 33%	(-) 0	(-) 43%	(+) 100	(+) 24%
Producción de ácido a partir de:						
D-Adonitol	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)
L-Arabinosa	(+) 100	(+)	(+) 93	(+)	v	(+)
D. Arabitol	(+) 100	(+)	(+) 67	(+)	(+)	(+)
Celobiosa	(-) 14	(-) 61%	(+) 30	(+) 38.5%	(-) 11	(-) 38.5%
Dulcitol	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)
Glicerol	(+) 55	(+)	(-) 33	(+)	(+)	(+)
Inositol	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)
Maltosa	(+) 100	(+)	(+) 100	(+)	(+) 100	(+)
D-Manitol	(+) 100	(+)	(+) 100	(+)	(+) 100	(+)
D-Manosa	(+) 100	(+)	(+) 100	(+)	(+) v	(+)
Melibiosa	(-) 11	(-) 0	(-) 3	(-) 0	(-) 3	(-) 0
α-CH ₂ glucósido	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)
Ramnosa	(-) 45	(-)	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)
Salicina	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)
D-Sorbitol	(-) 22	(-)	(-) 31	(-)	(-) 7	(-)
Escualina	(-) 0	(-)	(-) 23	(-)	(-) 7	(-)

Almidón	(+) 20	(+)	(+) 31	(+)	(+) 100	(+)
Crecimiento en NaCl %						
0%	(-) 0	(+)	(-) 0	(+)	(+) 100	(+)
1%	(+) 99	(+)	(+) 99	(+)	(+) 100	(+)
3%	(+) 99	(+) 80%	(+) 99	(+) 80%	(+) 7	(-) 20%
7%	(+) 78	(+) 80%	(-) 71	(+) 80%	(-) 0	(-) 10%
Crecimiento a °C						
4 °C	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)	(-) 7	(-)
20 °C	(+) 100	(+) 100	(+) 100	(+) 100	(+) 100	(+) 100
36 °C	(+) 100	(+) 100	(+) 100	(+) 100	(+) 100	(+) 100
Catalasa	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Caseína	(+) 31	(+)	(+) 26	(+)	(+) 100	(+)
DNAasa	(+) 100	(+) 100	(+) 100	(+) 100	(+) 100	(+) 100
Luminiscencia	(-) 0	(-) 0	(-) 0	(-) 0	(-) 0	(-) 0
Quitinasa	(+) 0	(+)	(+) 31	(+)	(+) 100	(+)
Hemolisina	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Etanol	(-) 5	(-)	(-) 22	(-)	(-) 5	(-)
Sacarosa	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Putrecina	(+) 100	(+) 93%	(+) 31	(-) 7%	(-) 0	(-) 7%
Citrulina	(-) 0	(-) 10%	(+) 31	(+) 90%	(-) 0	(-) 10%
α-NH ₄ - valerato	(-) v 63	(-)	(-) 17	(-)	(-) 0	(-)
Propionato	(+) 0	(+)	(-) 27	(-)	(-) 0	(-)
Tiosulfato citrat bilis sales sucrosa	(+)Amarillo	(+)Amarillo	(+)Amarillo	(+)Amarillo	(+)Verde	(+)Verde
Agar Aeromonas	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Agar Pseudomonas	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
NO ³ - NO ²	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Oxidasa	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Vibriostático O/129, sensibilidad 10 µg	(-) 0	(-)	(-) 31	(-)	(+)	(+)
Glucuronato	(-) 7	(+)	(+) 94	(+)	(-) 10	(-)
o-nitrofenil-b- galactopiranosido	(-) 35	(-)	(-) 40	(-)	(-)	(-)
Tween 80	(+) 26	(+)	(+) 31	(+)	(+)	(+)

(+) 90-100% reacción positiva

(-) 0-10% reacción negativa

* reacciones en cepas de colección

Tabla 18. Caracteres bioquímicos para diferenciar a *A. hydrophila* de *V. fluvialis* y *V. furnissii*.

Cepa	TCBS	glucosaz/gas	O/129	NaCl %				Hemólisis	Putrescina	Citrulina	Esculina	Quitinasa	Celulobiosa	Identificación
				0%	1%	3%	6%							
5	V	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Aeromonas hydrophila</i>	
6	A	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Vibrio furnissii</i>	
7	V	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Aeromonas hydrophila</i>	
9	V	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Aeromonas hydrophila</i>	
12	V	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Aeromonas hydrophila</i>	
14	A	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Vibrio furnissii</i>	
15	V	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Aeromonas hydrophila</i>	
17	A	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Vibrio furnissii</i>	
18	V	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Aeromonas hydrophila</i>	
21	V	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Aeromonas hydrophila</i>	
22	A	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Vibrio furnissii</i>	
23	A	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Vibrio furnissii</i>	
26	A	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Vibrio furnissii</i>	
28	V	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Aeromonas hydrophila</i>	
32	A	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Vibrio furnissii</i>	
34	A	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Vibrio furnissii</i>	
35	A	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Vibrio furnissii</i>	
36	V	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Aeromonas hydrophila</i>	
41	V	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Aeromonas hydrophila</i>	
45	A	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Vibrio fluvialis</i>	
48	A	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Vibrio furnissii</i>	
48	V	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Aeromonas hydrophila</i>	
51	A	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Vibrio furnissii</i>	
52	A	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Vibrio fluvialis</i>	
53	A	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Vibrio furnissii</i>	
57	A	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Vibrio furnissii</i>	
59	A	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Vibrio fluvialis</i>	
60	A	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Vibrio furnissii</i>	
62	A	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Vibrio furnissii</i>	
63	A	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Vibrio furnissii</i>	

RESULTADOS

136	A	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	<i>Vibrio fluvialis</i>
137	V	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>Vibrio furnissii</i>
138	V	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Aeromonas hydrophila</i>
139	A	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Vibrio fluvialis</i>
140	A	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Vibrio furnissii</i>
141	A	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Vibrio fluvialis</i>
142	V	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>Aeromonas hydrophila</i>
143	A	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Vibrio fluvialis</i>
144	A	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Vibrio furnissii</i>
146	V	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>Aeromonas hydrophila</i>
147	A	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Vibrio fluvialis</i>
148	A	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Vibrio furnissii</i>
149	A	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>Aeromonas hydrophila</i>

A. colonias amarillas

V. colonias verdes o azules

(-) no crecimiento

(+) crecimiento

Tabla 19. Caracteres bioquímicos específicos para diferenciar *V. furnissii* (ATCC 35016), *V. fluvialis* (NCTC 11327), *A. hydrophila* (ATCC 35649) y cepas silvestres.

Prueba	<i>V. furnissii</i>		<i>V. fluvialis</i>		<i>A. hydrophila</i>	
	<i>furnissii</i>	silvestres	<i>fluvialis</i>	silvestres	<i>hydrophila</i>	silvestres
Gas de glucosa	(+) 100	(+) 33	(-) 0	(-) 43	(+) 100	(+) 24
Celobiosa	(-) 14	(-) 61	(+) 30	(+) 38	(-) 11	(-) 38
Crecimiento en NaCl%						
0%	(-) 0	(+)	(-) 0	(+)	(+) 100	(+)
1%	(+) 99	(+)	(+) 99	(+)	(+) 100	(+)
3%	(+) 99	(+) 80	(+) 99	(+) 80	(+) 7	(-) 20
7%	(+) 78	(+) 80	(-) 71	(+) 80	(-) 0	(-) 10
Putrecina	(+) 100	(+) 93	(+) 31	(-) 7	(-) 0	(-) 7
Citrulina	(-) 0	(-) 10	(-) 31	(+) 90	(-) 0	(-) 10
Propionato	(+) 0	(+)	(-) 27	(-)	(-) 0	(-)
TCBS	Amarillas	(+) Amarillas	(Amarilla)	Amarilla	Verde-Azul	Verde-Azul
Sensibilidad al vibriostático $\alpha/129$, 10 μ g	(-) 0	(-) 0	(-) 31%	(-)	(+)	(+)

(+) 90-100% reacción positiva

(-) 0-10% reacción negativa

* reacción en cepas de colección

Pruebas bioquímicas complementarias según: Colwell, 1984; Cown, 1974; Furniss et al., 1977; Lee et al., 1981; Brienner et al., 1983; Altereeg et al., 1990; Dasilgard et al., 1998; Manual de Bergey, 1999.

Únicamente las pruebas de producción de gas a partir de glucosa y crecimiento en TCBS, ofrecieron porcentajes objetivos para poder establecer presuntivamente la diferencia entre las tres especies, razón por la cual se aplicó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP), para tratar de diferenciar con precisión las cepas de los dos géneros en cuestión, *Aeromonas* y *Vibrio*.

Con la aplicación de los oligonucleótidos Aer8 y Aer9, así como Vib1 y Vib 2 durante la Reacción en Cadena de la Polimerasa, se logró la ampliación del DNA de las bacterias estudiadas pero a nivel de géneros, con lo que se logró establecer una diferencia entre los *Aeromonas* y *Vibrio* (Figuras 2 y 3).

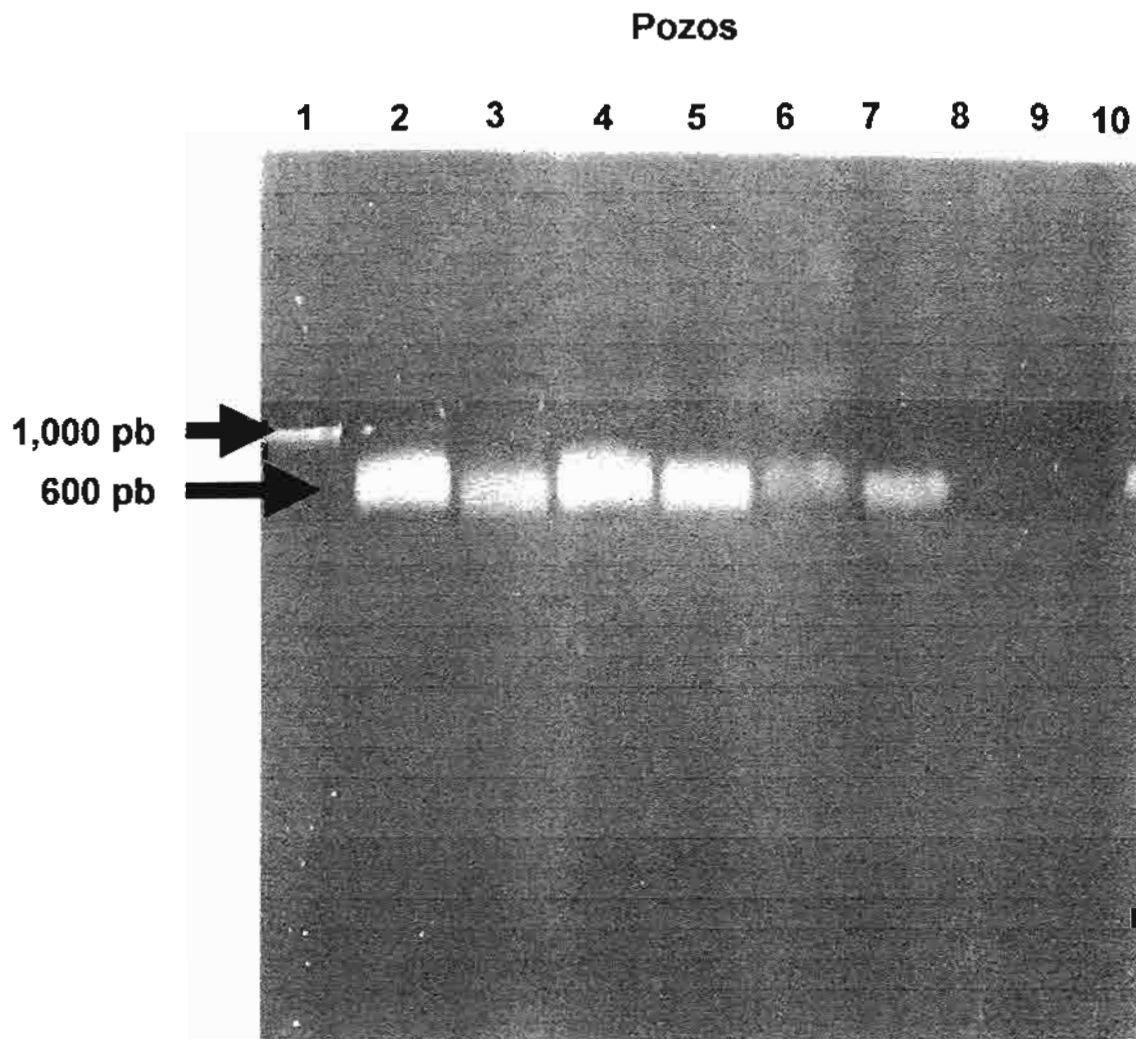


Figura 2. Gel de agarosa al 1%. Pozo marcador de 1,000 pb (In-Vitrogen). Pozo 2 a 9 cepas silvestres, pozo 10 cepa de colección de *V. alginolyticus*. Oligonucleótidos Aer8 y Aer9 (Khan y Cerniglia, 1977).

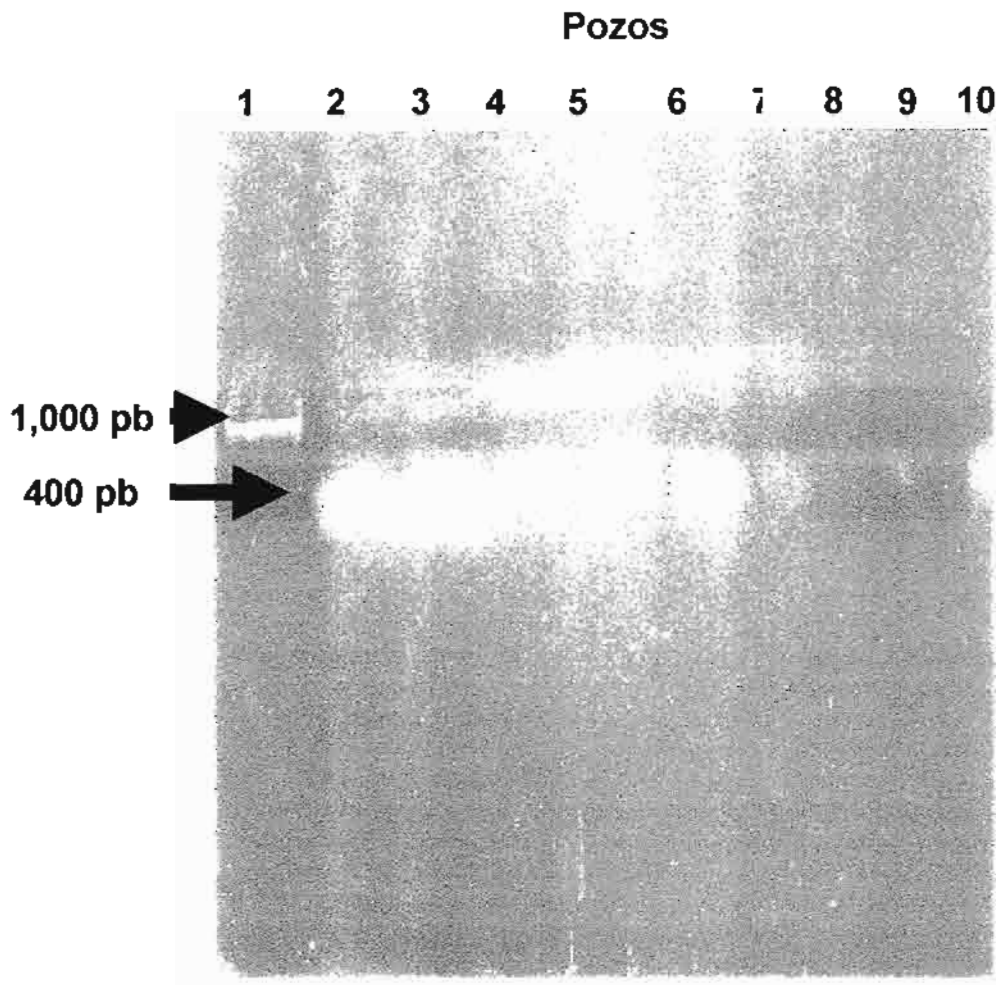


Figura 3. Gel de agarosa al 1%. Pozo 1 marcador de 1,000 pb (Fermentas). Pozos 2 a 9 cepas silvestres, pozo 10 cepa de colección *A. hydrophila*. Producto de PCR con peso molecular de 400 pb. Oligonucleótidos Vib1 y Vib2 (Zanetti, et al., 1992).

La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa se aplicó a 60 cepas identificadas previamente como *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis* y *Vibrio furnissii*, con las galerías del API-20E y del API-20NE, coincidiendo ambos sistemas a nivel de género en 59 de estas especies. Únicamente con una cepa no se logró la misma identificación, la cepa 131, identificada previamente como *Aeromonas hydrophila*.

La técnica de RCP se estandarizó empleando cepas de colección (mencionadas en el apartado de metodología) de las que también se obtuvo el producto correspondiente.

Determinación de la patogenicidad y D₅₀L de *V. fluvialis* y *V. furnissii*.

Todos los peces que se extrajeron de los estanques de cultivo de las granjas, para obtener las muestras de riñón presentaron signos y lesiones externos de infección, así como un comportamiento anormal en los estanques de cultivo y en los acuarios. Los signos y lesiones aparentes fueron: puntos hemorrágicos en la superficie del cuerpo, aletas sanguinolentas y rotas, falta de escamas, exoftalmia, boqueo en la superficie de los estanques y acuarios, nado errático, desequilibrio, anorexia, y comportamiento nervioso y huidizo. Después de sacrificar a los individuos y antes de tomar la muestra bacteriológica, se observaron las siguientes lesiones: hemorragia interna generalizada a todos los órganos, líquido en el interior de toda la cavidad, daño en todos los órganos internos, las branquias en general se presentaron pálidas.

La titulación de inmunoglobulinas, efectuada previamente al experimento, reveló que los lotes de peces seleccionados para el experimento tuvieron contacto previo con ambas bacterias estudiadas, aunque los títulos obtenidos fueron bajos: 1:80 y 1:160 (Tabla 20 y 21).

Tabla 20. Titulación de inmunoglobulinas; grupos control y experimental 10^4 ufc/mL.

Diluciones		PEZ (<i>Corestius euratus</i>)											
		Control	Control	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1:10	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1:20	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1:40	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1:80	D	○	ⓧ	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1:160	E	Ⓩ	Ⓨ	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1:320	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1:640	G	○	○	○	○	○	○	○	Ⓨ	○	○	○	○
1:1280	H	○	○	Ⓨ	ⓧ	Ⓨ	Ⓩ	○	ⓧ	○	○	○	○
1:2560	I	○	○	ⓧ	○	Ⓨ	○	Ⓩ	○	Ⓩ	Ⓩ	Ⓩ	Ⓩ

V. fluvialis (x); *V. furnissii* (y); Ambos (z)

Tabla 21. Titulación de inmunoglobulinas; grupos control y experimental 10^3 ufc/mL.

Diluciones		PEZ (<i>Carassius auratus</i>)											
		Control	Control	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1:10	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1:20	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1:40	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1:80	D	○	X	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1:160	E	Z	Y	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1:320	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1:640	G	○	○	○	○	○	○	Z	Z	Z	X	○	Y
1:1280	H	○	○	X	X	X	Z	○	○	○	Y	X	X
1:2560	I	○	○	Y	Y	Y	○	○	○	○	○	Y	○

V. fluvialis (x); *V. furnissii* (y); Ambos (z)

Los peces incluidos en el grupo control inoculados únicamente con solución salina estéril, mostraron signos y lesiones generales de bacteriosis: escamas caedizas, edema, anorexia, se manifestaron muy nerviosos, mismos que desaparecieron a las 30 h del experimento, por lo que el estado "normal" (el observado antes del experimento) de comportamiento y salud de los individuos, se restableció, indicando que el estrés experimental tuvo importante influencia sobre el cuadro clínico obtenido experimentalmente (Tabla 22).

Tabla 22. Lote control de *C. auratus*, inoculados con solución salina al 8%.

Característica	Pez 1	Pez 2	Pez 3	Pez 4	Pez 5	Pez 6	Pez 7	Pez 8	Pez 9	Pez 10
Coloración	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Piel	Edema	Edema	Edema	Edema	Edema	Edema	Edema	Edema	Edema	Edema
Escamas	Erizadas	Erizadas	Erizadas	Erizadas	Erizadas	Erizadas	Erizadas	Erizadas	Erizadas	Erizadas
Aletas y cola	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Boca	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Branquias	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Ojos	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Cuerpo	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Apetito	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia
Comportamiento	Nerviosismo	Nerviosismo	Nerviosismo	Nerviosismo	Nerviosismo	Nerviosismo	Nerviosismo	Nerviosismo	Nerviosismo	Nerviosismo
Heces	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Nado	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Secreciones	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

* No hubo presencia de signos

Los grupos experimentales inoculados con 10^7 , 10^6 y 10^5 ufc/mL del patógeno *V. fluvialis*, empezaron a mostrar signos de infección tres horas después de ser inoculados. Algunos individuos mostraron cambios de coloración de la piel, en su mayoría se oscurecieron o bien se tornaron más rojos, presentaron edema corporal, escamas erizadas o caedizas, aletas deshilachadas o con finos filamentos sanguinolentos, respiración anormal sobre la superficie de los acuarios, rápido boqueo y apertura de opérculos, algunos peces mostraron los ojos opacos, otros exoftálmicos, cuerpo hinchado y anorexia. Algunos individuos se comportaron de una forma anormal en comparación con los del grupo control, desarrollando nado nervioso, únicamente los peces del grupo de 10^5 sufrieron de diarrea, mostraron además nado desordenado o lento. En todos los peces de todos los lotes experimentales se apreció una secreción exagerada de moco sobre el cuerpo. Todos los peces de estos grupos murieron durante las primeras 24 h del experimento. Inmediatamente se efectuaron las necropsias, encontrándose signos y daños agudos en todos los órganos internos de los peces, se pudo apreciar mal

olor, hemorragia generalizada a todos los órganos, músculos, hígado y riñón deshecho (Tablas 23, 24 y 25).

Tabla 23. Signos y lesiones mostradas por *C. auratus*, inoculadas con 10^7 ufc/mL de *V. fluvialis*.

CARACTERIZACIÓN DIAGNÓSTICA										
Característica	Pez 1	Pez 2	Pez 3	Pez 4	Pez 5	Pez 6	Pez 7	Pez 8	Pez 9	Pez 10
Coloración	*	*	*	*	*	*	Opaco	Opaco	*	Opaco
Piel	*	*	*	*	*	*	Edema necrosis	Edema necrosis	*	Edema necrosis
Escamas	*	*	*	*	*	*	Descamación	Descamación	Descamación	Descamación
Aletas y cola	Replegadas	Replegadas	Replegadas	Replegadas	Replegadas	Replegadas	Replegadas	Replegadas erosionadas	Replegadas	Replegadas erosionadas
Boca	Boqueo anormal	Boqueo anormal	Boqueo anormal	Boqueo anormal	Boqueo anormal	Boqueo anormal	Boqueo anormal	Boqueo anormal	Boqueo anormal	Boqueo anormal
Branquias	Operculos abiertos	*	*	*	*	Respiración anormal	Respiración anormal	Respiración anormal	*	Respiración anormal
Ojos	Exoftalmia	Exoftalmia	Exoftalmia	Exoftalmia	Exoftalmia	Exoftalmia	Exoftalmia	Exoftalmia	Exoftalmia	Inflamados
Cuerpo	Ventre abultado	Ventre abultado	Ventre abultado	Ventre abultado	Ventre abultado	Ventre abultado	Ventre abultado	Ventre abultado	Ventre abultado	Ventre abultado
Apetito	No fue alimentado	No fue alimentado	No fue alimentado	No fue alimentado	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	No fue alimentado	Anorexia
Comportamiento	Inmóvil	Inmóvil	Inmóvil	Inmóvil	Inmóvil	Inmóvil	Inmóvil	Inmóvil	Inmóvil	Inmóvil
Heces	No defecó	No defecó	No defecó	No defecó	No defecó	No defecó	No defecó	No defecó	No defecó	No defecó
Nado	Errático	Errático	Errático	Errático	Errático	Errático	Inmóvil	Inmóvil	Errático	Errático
Secreciones	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad
NECROPSIAS										
Boca	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Piel	*	*	*	*	Descamación	Descamación	Descamación	*	*	*
Tubo digestivo	Inflamado desecho hemorragia	Inflamado desecho hemorragia	Inflamado desecho hemorragia	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado hemorragia	Inflamado	Inflamado
Riñón	Deshecho	Deshecho	Deshecho c/ líquido	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho enrojecido	Deshecho c/ petequias	Enrojecido
Hígado	Inflamado	Inflamado	*	*	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho
Vesícula biliar y bazo	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Vejiga natatoria	*	*	*	*	*	*	*	Dañada	*	*
Gónadas	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Músculo	Necrosis	*	*	*	*	Necrosis	Necrosis	Necrosis	*	Necrosis
Olor	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	desagradable	Ninguno

* No hubo presencia de signos

Tabla 24. Signos y lesiones de *C. auratus* inoculados con 10^6 ufc/mL de *V. fluvialis*.

CARACTERIZACIÓN DIAGNÓSTICA										
Característica	Pez 1	Pez 2	Pez 3	Pez 4	Pez 5	Pez 6	Pez 7	Pez 8	Pez 9	Pez 10
Coloración	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Piel	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Escamas	Descamación	*	Descamación	Descamación	Descamación	Descamación	*	Descamación	Descamación	Descamación

Aletas y cola	Erosionadas	Erosionadas	Erosionadas	Erosionadas	Erosionadas	Hemorragia	Hemorragia	Erosionada	Hemorragia	Hemorragia
Boca	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Branquias	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Ojos	Exoftalmia	Exoftalmia	Exoftalmia	Exoftalmia	Exoftalmia	Exoftalmia	Exoftalmia	Exoftalmia	Exoftalmia	Exoftalmia
Cuerpo	Vientre abultado	Vientre abultado	Vientre abultado	Vientre abultado	Vientre abultado	Vientre abultado	Vientre abultado	Vientre abultado	Vientre abultado	Vientre abultado
Apetito	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia
Comportamiento	anormal	anormal	anormal	anormal	anormal	anormal	anormal	anormal	anormal	anormal
Heces	No observado	No observado	No observado	No observado	No observado	No observado	No observado	No observado	No observado	No observado
Nado	Errático	Errático	Errático	Errático	Errático	Errático	Errático	Errático	Errático	Errático
Secreciones	Mucosidad	Mucosidad	*	Mucosidad	Mucosidad	*	Mucosidad	Mucosidad	*	*
NECRÓPSIAS										
Boca	Hemorragia	*	*	*	*	*	*	*	*	Hemorragia
Piel	Mucosidad	Descamación	No observado	Mucosidad	Mucosidad	No observado	No observado	No observado	No observado	No observado
Tubo digestivo	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho
Riñón	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho
Hígado	Deshecho	Necrosado	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho
Vesícula biliar y bazo	Inflamada	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Vejiga natatoria	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Gónadas										
Musculo										
Olor	Desagradable	Desagradable	*	*	*	Desagradable	Desagradable	*	Desagradable	*

* No hubo presencia de signos

Tabla 25. Signos y lesiones de *C. auratus* inoculados con 10^5 cuf/mL de *V. fluvialis*.

CARACTERIZACIÓN DIAGNÓSTICA										
Característica	Pez 1	Pez 2	Pez 3	Pez 4	Pez 5	Pez 6	Pez 7	Pez 8	Pez 9	Pez 10
Coloración	Opaco	Opaco	*	*	*	Enrojecido	Enrojecido	Enrojecido	Enrojecido	Enrojecido
Piel	Edema	Edema	*	Edema	*	Edema	Edema	*	Edema	*
Escamas	*	*	*	*	Descamación	Descamación	*	*	*	*
Aletas y cola	*	*	*	Erosionadas	*	*	*	*	*	*
Boca	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Branquias										
Ojos	Exoftalmia	Turbidez	*	*	Turbidez	Turbidez	Turbidez	Turbidez	*	*
Cuerpo	Vientre abultado	*	*	*	*	Vientre abultado	Vientre abultado	Vientre abultado	Vientre abultado	*
Apetito	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia
Comportamiento	Anormal	Anormal	Anormal	*	Anormal	Anormal	Anormal	Anormal	Anormal	Anormal
Heces	Diarrea	Diarrea	*	Diarrea	Diarrea	Diarrea	Diarrea	Diarrea	Diarrea	Diarrea
Nado	Errático	Errático	Errático	*	Errático	*	*	Errático	*	Errático
Secreciones	Mucosidad	Mucosidad	*	*	*	Mucosidad	Mucosidad	*	Mucosidad	*
NECRÓPSIA										
Boca	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Piel	Descamación	Descamación	*	*	*	*	*	Descamación	*	*
Tubo digestivo				Deshecho	Deshecho			Deshecho	Deshecho	Deshecho

Riñón	Deshecho	Deshecho		Deshecho		Deshecho	Deshecho	Deshecho		
Hígado	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho		Deshecho	Deshecho			
Vesícula biliar y bazo	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Vejiga Natatoria	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Gónadas	*	*	Dañadas	Dañadas	*	*	*	*	*	*
Músculo	*	*	Inflamado	Enrojecido	*	Necrosado	Inflamado	*	Inflamado	Inflamado
Olor	Desagradable	Desagradable	Desagradable	*	*	Desagradable	Desagradable	*	*	*

* No hubo presencia de signos

Los grupos experimentales inoculados con las dosis 10^4 y 10^3 ufc/mL, del mismo patógeno, comenzaron a manifestar signos de infección a las 72 h de ser inoculados. En este caso se identificaron signos y lesiones de bacteriosis general: el color corporal de estos individuos se oscureció en algunos casos, en otros se enrojecieron, los ojos se tornaron opacos, se detectó surgimiento de micosis sobre el cuerpo de los peces, escamas caedizas en algunas zonas del cuerpo, aletas replegadas y erosionadas y anorexia. El comportamiento se observó nervioso con nado lento, importante secreción de moco por todo el cuerpo.

Después de ocho días, todos los individuos de estos grupos recuperaron su estado de salud inicial, aún permanecieron vivos (Tablas 26 y 27).

Tabla 26. Signos y lesiones de *C. auratus* inoculados con 10^4 cuf/mL de *V. fluvialis*.

Característica	Pez 1	Pez 2	Pez 3	Pez 4	Pez 5	Pez 6	Pez 7	Pez 8	Pez 9	Pez 10
Coloración	Opaco	Opaco	Opaco	Opaco	Opaco	Opaco	Opaco	Opaco	Opaco	Opaco
Piel		*	*	Micosis			Micosis		*	
Escamas	Descamación	Descamación	Descamación	Descamación	Descamación	Descamación	Descamación	Descamación	Descamación	Descamación
Aletas y Cola	Hemorragia	Hemorragia	Hemorragia	Erosionadas	Hemorragia	*	Erosionadas	Hemorragia	Replegadas	Erosionadas
Boca	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Branquias	Oscuras	*	*	*	Oscuras	*	*	*	*	*
Ojos	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Cuerpo	*	Ventre abultado	Ventre abultado	*	Ventre abultado	Ventre abultado	Ventre abultado	Ventre abultado	Ventre abultado	Ventre abultado
Apetito	Anorexia	Anorexia	Anorexia	*	*	*	*	*	*	*
Comportamiento	Nervioso	Nervioso	Nervioso	Nervioso	Nervioso	Nervioso	Nervioso	Nervioso	Nervioso	Nervioso
Hecas										
Nado	Lento	Lento	*	*	Lento	Lento	Lento	Lento	Lento	*
Secreciones	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad				Mucosidad	Mucosidad	

* No hubo presencia de signos

Tabla 27. Signos y lesiones de *C. auratus* inoculados con 10^3 cfu/mL de *V. fluvialis*.

Característica.	Pez 1	Pez 2	Pez 3	Pez 4	Pez 5	Pez 6	Pez 7	Pez 8	Pez 9	Pez 10
Coloración	*	*	*	*	*	Oscuro	Oscuro	Opaco	Opaco	Oscuro
Piel	*	*	*	*	*	Micosis	Micosis	*	Micosis	Micosis
Escamas	*	Descamación	Descamación	Descamación	*	*	Descamación	*	*	Descamación
Aletas y cola	Erosionadas	Micosis	Micosis	*	Replegadas	Erosionadas	Micosis	*	*	*
Boca	*	*	Boqueo	*	Boqueo anormal	*	Boqueo anormal	Boqueo anormal	Boqueo anormal	Boqueo anormal
Branquias	Hemorragia	*	Respiración anormal	*	Respiración anormal	*	Respiración anormal	Respiración anormal	Respiración anormal	Respiración anormal
Ojos	Exoftalmia	*	Exoftalmia	*	*	*	*	*	*	*
Cuerpo	Ventre abultado	Hemorragia	Ventre abultado	Ventre abultado	Ventre abultado	Ventre abultado	Ventre abultado	Ventre abultado	Ventre abultado	Ventre abultado
Apetito	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia
Comportamiento	Nervioso	Nervioso	Nervioso	Nervioso	Nervioso	Nervioso	Nervioso	Nervioso	Nervioso	Nervioso
Heces										
Nado	Errático	*	*	*	*	Errático	Errático	Errático	Errático	Errático
Secreciones	*	*	*	*	*	Mucosidad	*	Mucosidad	*	Mucosidad

* No hubo presencia de signos

La titulación de inmunoglobulinas efectuada en los peces que sobrevivieron al experimento, marcó un incremento en los títulos: 1:1280 y 1:2560, indicando que se generaron defensas contra los patógenos inoculados (Tablas 20 y 21).

Paralelamente el grupo de peces inoculados con 10^7 ufc/mL del patógeno *V. furnissii*, mostraron signos de infección con hemorragia en la base de las aletas y alrededor de los ojos, inflamación en la zona ventral, decoloración nado irregular, boqueo, anorexia, aletas y cola erosionadas, presencia de moco sobre la superficie del cuerpo, descamación y exoftalmia. A las 24 h en los inoculados se presentó la muerte en todos los individuos estudiados. Las necropsias mostraron de manera general en los 10 peces: hemorragia interna, tracto digestivo dañado y riñón desecho (Tablas 28 a 32).

Tabla 28. Signos y lesiones de *C. auratus* inoculados con 10^7 cfu/mL de *V. furnissii*.

Característica	Pez 1	Pez 2	Pez 3	Pez 4	Pez 5	Pez 6	Pez 7	Pez 8	Pez 9	Pez 10
Coloración	Decoloración	Normal	Decoloración	Normal	Decoloración	Decoloración	Decoloración	Normal	Normal	Normal
Piel	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad
Escamas	Descamación	Descamación	Descamación	Descamación	Descamación	Descamación	Descamación	Descamación	Descamación	Descamación
Aletas y cola	Erosionadas	Hemorrágicas	Erosionadas	Erosionadas	Erosionadas	Hemorragia	Hemorragia	Erosionada	Hemorragia	Hemorragia
Boca	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Branquias	Pálidas	Pálidas	Pálidas	Pálidas	Pálidas	Pálidas	Pálidas	Pálidas	Pálidas	Pálidas
Ojos	Exoftalmia	Exoftalmia	Exoftalmia	Exoftalmia	Exoftalmia	Exoftalmia	Exoftalmia	Exoftalmia	Exoftalmia	Exoftalmia
Cuerpo	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado
Apetito	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia
Comportamiento	Inmovil	Nervioso	Huidizo	Inmovil	Huidizo	Huidizo	Huidizo	Huidizo	Huidizo	Huidizo
Heces	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Nado	Lento	Lento	lento	Lento	Lento	Lento	Lento	Lento	Lento	Lento
Secreciones	Mucosidad	Mucosidad	*	Mucosidad	Mucosidad	*	Mucosidad	Mucosidad	*	*
NECROPSIAS										
Boca	Hemorragia	*	*	*	*	*	*	*	*	Hemorragia
Piel	Mucosidad	Descamación	*	Mucosidad	Mucosidad	*	*	*	*	*
Tubo digestivo	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Líquido	Hemorrágico	Hemorrágico	Hemorrágico	Hemorrágico	Hemorrágico	Hemorrágico
Riñón	Deshecho	Deshecho	Hemorrágico	Hemorrágico	Hemorrágico	Hemorrágico	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho
Hígado	Inflamado	Inflamado	Pálido	Pálido	Deshecho	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado
Vesícula biliar y bazo	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado
Vejiga natatoria	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Gónadas	Deshechas	Inflamadas	Inflamadas	Deshechas	Deshechas	Inflamadas	Inflamadas	Deshechas	Hemorrágicas	hemorrágicas
Músculo	*									
Olor	Desagradable	Desagradable	*	*	*	Desagradable	Desagradable	*	Desagradable	*
* No hubo presencia de signos										

Tabla 29. Signos y lesiones de *C. auratus* inoculados con 10^6 cfu/mL de *V. furnissii*.

CARACTERIZACIÓN DIAGNÓSTICA										
Característica	Pez 1	Pez 2	Pez 3	Pez 4	Pez 5	Pez 6	Pez 7	Pez 8	Pez 9	Pez 10
Coloración	Decoloración	Normal	Decoloración	Normal	Decoloración	Normal	Decoloración	Normal	Normal	Normal
Piel	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad
Escamas	Descamación	Descamación	Descamación	Descamación	Descamación	Descamación	Descamación	Descamación	Descamación	Descamación
Aletas y cola	Erosionadas	Hemorrágica	Erosionadas	Hemorrágica	Erosionadas	Hemorragia	Hemorragia	Hemorrágica	Erosionadas	Erosionadas
Boca	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Branquias	Pálidas	Pálidas	Pálidas	Pálidas	Pálidas	Pálidas	Pálidas	Pálidas	Pálidas	Pálidas
Ojos	Exoftalmia	Hemorrágicos	Exoftalmia	Hemorrágicos	Hemorrágicos	Hemorrágicos	Hemorrágicos	Hemorrágicos	Exoftalmia	Exoftalmia
Cuerpo	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado
Apetito	Anorexia	Irregular	Irregular	Irregular	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Irregular	Irregular	Irregular
Comportamiento	Pasivo	Huidizo	Huidizo	Pasivo	Huidizo	Huidizo	Huidizo	Huidizo	Huidizo	Huidizo

Heces	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Nado	Errático	Errático	Errático	Errático	Errático	Errático	Errático	Errático	Errático	Errático
Secreciones	Mucosidad	Mucosidad	*	Mucosidad	Mucosidad	*	Mucosidad	Mucosidad	*	*
NECROPSIAS										
Boca	*	*	*	*	*	*	*	*	*	Hemorragia
Piel	Mucosidad	Descamación	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad
Tubo digestivo	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Hemorrágico	Dañado	Hemorrágicos	Deshecho	Deshecho	Hemorrágico	Deshecho
Riñón	Deshecho	Deshecho	Hemorrágico	Hemorrágico	Hemorrágico	Hemorrágico	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho
Hígado	Pálido	Inflamado	Pálido	Pálido	Pálido	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado
Vesícula biliar y bazo	Inflamado	Inflamado	Inflamado	*	Inflamado	Inflamado	*	Inflamado	*	Inflamado
Vejiga natatoria	*	Colapsada	*	*	*	Colapsada	*	*	Colapsada	*
Gónadas	Desechas	Inflamadas	Inflamadas	Inflamadas	Inflamadas	Inflamadas	Dañadas	Desechas	Hemorrágicas	Hemorrágicas
Músculo	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Olor	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

* No hubo presencia de signos

Tabla 30. Signos y lesiones de *C. auratus* inoculados con 10^5 cfu/mL de *V. fumissii*.

Coloración	Pez 1	Pez 2	Pez 3	Pez 4	Pez 5	Pez 6	Pez 7	Pez 8	Pez 9	Pez 10
Piel	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Escamas	Descamación	*	Descamación	Descamación	Descamación	Descamación	*	Descamación	Descamación	Descamación
Alas y cola	Erosionadas	Erosionadas	Erosionadas	Erosionadas	Erosionadas	Hemorragia	Hemorragia	Erosionada	Hemorragia	Hemorragia
Boca	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Branquias	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Ojos	Exoftalmia	Exoftalmia	Exoftalmia	Exoftalmia	Exoftalmia	Exoftalmia	Exoftalmia	Exoftalmia	Exoftalmia	Exoftalmia
Cuerpo	Inflamado	Inflamado	*	Inflamado	Inflamado	*	*	*	*	*
Apetito	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia
Comportamiento	Anormal	Anormal	Anormal	Anormal	Anormal	Anormal	Anormal	Anormal	Anormal	Anormal
Heces	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Nado	Errático	Errático	Errático	Errático	Errático	Errático	Errático	Errático	Errático	Errático
Secreciones	Mucosidad	Mucosidad	*	Mucosidad	Mucosidad	*	Mucosidad	Mucosidad	*	*
NECROPSIAS										
Boca	Hemorragia	*	*	*	*	*	*	*	*	Hemorragia
Piel	Mucosidad	Descamación	*	Mucosidad	Mucosidad	*	*	*	*	*
Tubo digestivo	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho
Riñón	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho
Hígado	Deshecho	Necrosado	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho	Deshecho
Vesícula biliar y bazo	Inflamada	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Vejiga natatoria	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Gónadas										
Músculo										
Olor	Desagradable	Desagradable	*	*	*	Desagradable	Desagradable	*	Desagradable	*

* No hubo presencia de signos

Tabla 31. Signos y lesiones de *C. auratus* inoculados con 10^4 cuf/mL de *V. furnissii*.

Característica.	Pez 1	Pez 2	Pez 3	Pez 4	Pez 5	Pez 6	Pez 7	Pez 8	Pez 9	Pez 10
Coloración	*	*	Decoloración	*	*	*	*	*	*	*
Piel	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad
Escamas	Descamación	Descamación	Descamación	*	*	Descamación	Descamación	*	Descamación	Descamación
Aletas y cola	Erosionadas	Replegadas	Erosionadas	*	Replegadas	*	Replegadas	*	*	*
Boca	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Branquias	Pálidas	*	*	Pálidas	*	*	Pálidas	*	Pálidas	*
Ojos	Exoftalmia	*	Exoftalmia	*	*	*	Hemorrágicas	*	*	*
Cuerpo	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado
Apetito	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia
Comportamiento	Inmovil	Pasivo	Huidizo	Normal	Huidizo	Huidizo	Huidizo	Huidizo	Nerviosos	Nerviosos
Heces	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Nado	Errático	Lento	Errático	Descordinado	Errático	Lento	Errático	Lento	Errático	Errático
Secreciones	*	*	*	*	*	Mucosidad	*	Mucosidad	*	Mucosidad

* No hubo presencia de signos

Tabla 32. Signos y lesiones de *C. auratus* inoculados con 10^3 cuf/mL de *V. furnissii*.

Característica	Pez 1	Pez 2	Pez 3	Pez 4	Pez 5	Pez 6	Pez 7	Pez 8	Pez 9	Pez 10
Coloración	*	*	*	*	*	Oscuro	Oscuro	Opaco	Opaco	Oscuro
Piel	*	*	*	*	*	Micosis	Micosis	*	Micosis	Micosis
Escamas	*	Descamación	Descamación	Descamación	*	*	Descamación	*	*	Descamación
Aletas y cola	Erosionadas	Micosis	Micosis	*	Replegadas	Erosionadas	Micosis	*	*	*
Boca	*	*	Boqueo	*	Boqueo	*	Boqueo	Boqueo	*	*
Branquias	Hemorragia	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Ojos	Exoftalmia	*	Exoftalmia	*	*	*	*	*	*	*
Cuerpo	Inflamado	*	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado	Inflamado
Apetito	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia
Comportamiento	Nervioso	Nervioso	Nervioso	Nervioso	Nervioso	Nervioso	Nervioso	Nervioso	Nervioso	Nervioso
Heces										
Nado	Errático	*	*	*	*	Errático	Errático	Errático	Errático	Errático
Secreciones	*	*	*	*	*	Mucosidad	*	Mucosidad	*	Mucosidad

* No hubo presencia de signos

De igual forma, en los lotes experimentales de peces inoculados con 10^6 y 10^5 ufc/mL los signos y lesiones de enfermedad se fueron presentando de forma más

lenta: boqueo, nado irregular y espasmódico, hemorragia en la base de las aletas y en los ojos, inflamación ventral, descamación, presencia abundante de moco, y pérdida del apetito. Los diez individuos de este lote murieron durante el lapso de 48 h. Después de la necrosis se observaron los mismos daños que en el lote anterior.

En los lotes experimentales de inóculos 10^4 , 10^3 ufc/mL, los peces mostraron nado irregular, boqueo, pérdida de apetito, ojos pálidos, sin embargo, después de 36 h los peces recuperaron su apetito de forma normal y en comparación con el lote control volvieron a la normalidad, y lograron sobrevivir. Todas las lesiones desaparecieron a los diez días del experimento.

Igualmente de la titulación de inmunoglobulinas efectuada con los peces sobrevivientes se encontró un incremento en el nivel original de los títulos de éstas.

A partir de muestras aisladas del riñón de los peces inoculados 10^7 , 10^6 y 10^5 ufc/mL de bacterias tanto de *V. fluvialis* como de *V. furnissii*, se recuperaron ambos patógenos en cultivo puro.

Al graficar el número de peces muertos de cada grupo experimental en papel probit, se determinó $10^{4.5}$ ufc/mL como la D_{50} L para *V. fluvialis* y *V. furnissii*.

En la segunda fase experimental, solamente se registraron algunos signos leves de infección bacteriana, como son: oscurecimiento de la piel, anorexia, aletas retraídas, los cuales desaparecieron después de diez días, ningún pez murió.

La caracterización diagnóstica general de ambas especies de *Vibrio*, se resume en la tabla 33.

Tabla 33. Caracterización diagnóstica general de los peces inoculados con diferentes dosis infectivas de *V. fluvialis* y *V. furnissii*.

Características	Inóculo 7	Inóculo 6	Inóculo 5	Inóculo 4	Inóculo 3	Control
Coloración	*	*	Enrojecida	Opaco	*	*
Piel	Edema	*	Edema	Edema y micosis	*	Edema
Escamas	*	Descamación	Descamación	Descamación	Descamación	Enzadas
Aletas y cola	Replegadas	Erosionadas	Erosionadas	Hemorragia y erosionadas	*	*
Boca	Boqueo anormal	*	*	*	Boqueo anormal	*
Branquias	Respiración anormal	Respiración anormal	Respiración anormal	Oscuras	Respiración anormal	*
Ojos	*	*	Turbidez	*	*	*
Cuerpo	Ventre abultado	Ventre abultado	Ventre abultado	Ventre abultado	Ventre abultado	*
Apetito	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia
Comportamiento	Inmóvil	Anormal	Anormal	Nervioso	Nerviosismo	Nerviosismo
Heces	No defecaron	No observado	Diarrea	No observado	No observado	No observado
Nado	Errático	Errático	Errático	Lento	Errático	Errático
Secreciones	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad	Mucosidad	*	Mucosidad
NECROPSIA						
Boca	*	*	*			
Piel	Mucosidad y descamación	Mucosidad y descamación	Descamación			
Tubo digestivo	Hemorrágico	Deshecho	Deshecho			
Riñón		Deshecho	Deshecho			
Hígado	Deshecho	Deshecho	Deshecho			
Vesícula biliar y bazo	*	*	*			
Vejiga Natatoria	*	*	*			
Gónadas	*	*	Defiadas			
Músculo	Necrosis	Necrosis	Inflamado			
Olor	Ninguno	Desagradable	Desagradable			

 No se presentó mortalidad

Determinación de la sensibilidad a antibióticos y presencia de plásmidos-R.

Al someter las cepas a crecimiento en presencia de antibióticos, 45% de las cepas fueron resistentes a seis de los 14 antibióticos probados; el 100% de las cepas fueron resistentes a cefalotin, el 94% a la ampicilina, el 89% al cloranfenicol, 88% la tetraciclina. Además, fueron resistentes al nitrofurano, la carbenicilina, y la kanamicina en 85.3%, 61.3% y 65.3% respectivamente.

Presentaron sensibilidad 18 (23%) de las cepas, a los siguiente antibióticos: amikacina, trimetropin, cefotixin, nephilmecin, pefloxacina, y a la gentamicina. Sólo una cepa, la 9 de la especie *A. hydrophila*, presentó resistencia a todos los antibióticos, 20 cepas generaron resistencia a siete diferentes antibióticos, 67 de las 70, cepas generaron resistencia a más de un antibiótico (Tabla 34).

Tabla 34. Resistencia a antibióticos de cepas bacterianas aisladas de agua, alimento y pez dorado *C. auratus*.

Antibióticos	Resistente	Susceptible	Intermedio
Cefalotina	75	0	0
Cloranfenicol	26	23	23
Ceftriaxona	24	73	14
Ampicilina	71	3	1
Amikacina	12	60	3
Trimetropin	11	62	3
Cefotaxina	22	38	15
Netilmecina	18	57	0
Pefloxacina	7	41	27
Carbecilina	46	19	9
Gentamicina	64	7	4
Kanamicina	15	58	3
Nitrofurantoína	49	15	11
Tetraciclina	66	4	5

El menor porcentaje de los antibióticos (13%), resultó de resistencia intermedia para 23 cepas. Las cepas presentaron todavía sensibilidad a un buen número de antibióticos.

Se obtuvieron plásmidos resistentes en el 94% de las cepas, Las cepas de *A. hydrophila* portaron plásmidos con intervalos de pesos moleculares entre 22.5 – 6.6 kb , el 30% de estos fueron de 14.2 kb, estas cepas presentaron resistencia a los antibióticos: CF, T, NF, AMP, CB, y K ; en cepas de *Vibrio fluvialis* se extrajeron plásmidos con intervalos de pesos moleculares de 15 kb-6.9 kb el 58% de esta cepas portaron plásmidos de 11.2 kb, con resistencia a los antibióticos CF, AMP, T, NF, CB y K, las cepas de *Vibrio furnissii* presentaron plásmidos de

intervalos entre 14.2 kb y 6.6 kb, el 33% de las cuales portaban plásmidos de 11.2 kb. Fueron resistentes a CF, AMP, T, NF, CB y K (Tabla 35 y Figuras 4).

Tabla 35. Pesos moleculares y resistencia de los antibióticos en diferentes cepas bacterianas aisladas de agua, alimento y pez dorado *C. auratus*

Cepas	Resistencia antimicrobiana	Plásmidos (kb)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	CF-T-NF-AMP-CB-K	25.7, 22.5, 21.1, 20.16.3, 15, 14.2, 11.8 11.2, 6.9, 6.6
<i>Vibrio fluvialis</i>	CF-AMP-T-NF-K.	15, 13.6, 11.2, 6.9
<i>Vibrio furnissii</i>	CF-AMP-T-NF-CB-K.	15, 14.2, 13.8. 12.8, 11.8, 11.2 10, 6.9, 6.6
<i>Aeromonas hydrophila</i> (ATCC 53654)	CF-AMP-NF-K-T-CRO	25.7 *
<i>Aeromonas caviae</i> (ATCC 15468)	CF-AMP-T-NF-CRO-K	25.7 *
<i>Vibrio alginolyticus</i> (ATCC 177029)	CF-AMP-NF-K-T.CTX- NET	25.7 *
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (ATCC 17802)	CF-AMP-NF-K-T-CTX- NET	25.7 *

* Promega Life Science catalog 2001

Las cepas de colección presentaron resistencia para CF, AMP, NF, K y T; *V. parahaemolyticus*, *A. hydrophila* y *A. caviae* resistieron además para CRO y NF; *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio parahaemolyticus* presentaron resistencia para CTX y NET, todas portaron un plásmidos de 25.7 kb. La cepa de colección *E. coli* no registró resistencia a ningún antibiótico pero sí sensibilidad a todos, además de no portar ningún plásmido.

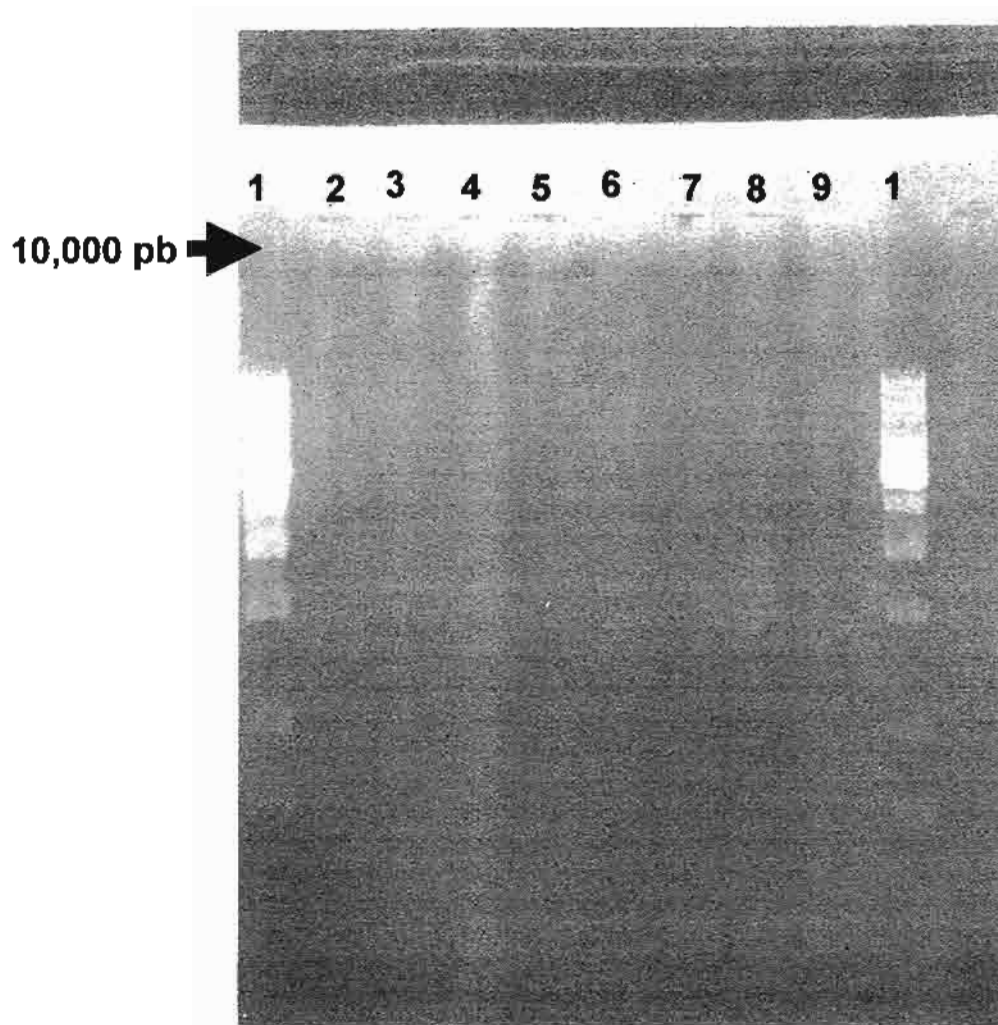


Figura 4. Electroforesis de gel de Agarosa al 1% pozo 1 y 10 marcador de peso molecular 10,000 pb Fermentas. Pozos del 2 al 9 cepas silvestres de *V. fluvialis*, *V. furnissii* y *A. hydrophila*.

Respecto a los plásmidos que se obtuvieron de las cepas identificadas como *Pseudomonas*, debido a los intervalos mayores en los pesos moleculares de las cepas de esta familia, se procedió de forma diferente para determinar su tamaño.

Con los plásmidos de referencia de *E. coli* (HB 101, R27 Y RP24) se obtuvo la curva de regresión lineal en la cual se graficó el logaritmo de la movilidad relativa de los plásmidos (eje de las ordenadas) y el peso molecular de los mismos expresados en Mda (eje de las abscisas). Los pesos moleculares de los plásmidos identificados se calcularon extrapolando el logaritmo de la movilidad relativa del ADN plasmídico para cada una de las extracciones en la curva obtenida, resultando los pesos moleculares y sus correspondientes número de pares de bases para cada uno de los plásmidos que se extrajeron de *Pseudomonas* (Tablas 36).

Tabla 36. Peso molecular de los plásmidos extraídos de *Pseudomonas* aisladas agua, alimento y de pez dorado *C. auratus*.

Pozo	Movilidad Relativa	log	Peso molecular	Mda	
1	Marcador de peso molecular				
	1.8	0.544	1000	286	
	3.5	0.7482	5143	147	
2	<i>Pseudomonas vesicularis</i>	5.6	0.2552	3214	91
		0.6	0.1461	3000	858
		1.1		16363	468
3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1.5		12000	343
		0.6	0.1461	3000	858
		1.1		16363	468
4	<i>Pseudomonas diminuta</i>	0.7	0.176	25714	735
		0.1	0.777	18000	514
5	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.6	0.2304	30000	858
		1	0.777	18000	514
		1.5		12000	343
6	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.5	0.413	30000	858
7	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.5	0.413	30000	858
8	<i>Pseudomonas diminuta</i>	0.5	0.413	30000	858
9	<i>Pseudomonas cepaciae</i>	0.5	0.413	30000	858
10	<i>Pseudomonas putida</i>	0.5	0.413	30000	858
11	<i>Pseudomonas sutzterii</i>	0.7	0.76	25714	735
		1.5		12000	343
		2.3		7826	223
		5.7		3127	89
12	Marcador de peso molecular	1.6	0.2552	11500	343
		3.4		5294	143

Al obtenerse pesos moleculares demasiado elevados, saliendo de la curva de regresión, se optó por usar marcadores de peso molecular conocidos, se registraron intervalos de peso molecular desde 3157 pb hasta 30000 pb . En los pozos del gel de agarosa: 2,3,4,5 y 11 se obtuvo más de una banda.

Se calcularon los MDa correspondientes a cada rango de pares de bases obteniendo rangos desde 286 MDa hasta 343 MDa.

No se estableció ninguna asociación especial de los datos obtenidos con el tipo de procedencia de las muestras de agua, alimento y organismo.

Determinación de relación de la virulencia con la presencia de plásmidos.

Las cepas de las tres especies *A. hydrophila*, *V. fluvialis* y *V. furnissii*, crecieron en placa de agar en sangre, presentando un crecimiento con halos color verde alrededor de las colonias indicando actividad de α -hemólisis (Figura 5).

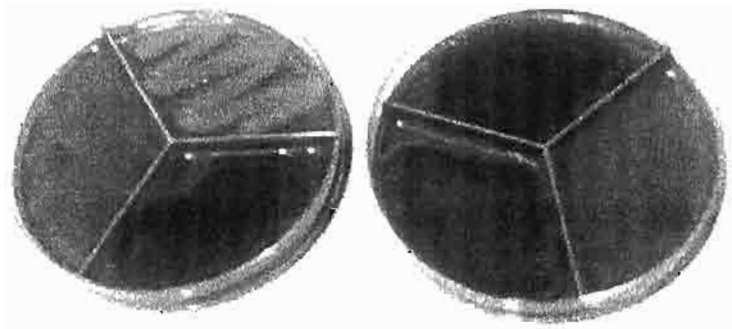


Figura 5. Crecimiento de las bacterias en agar en sangre.

Todas las cepas que presentaron crecimiento en agar sangre con producción de alfa hemólisis, fueron portadoras de plásmidos, con sensibilidad a diferentes antibióticos (Figura 6).

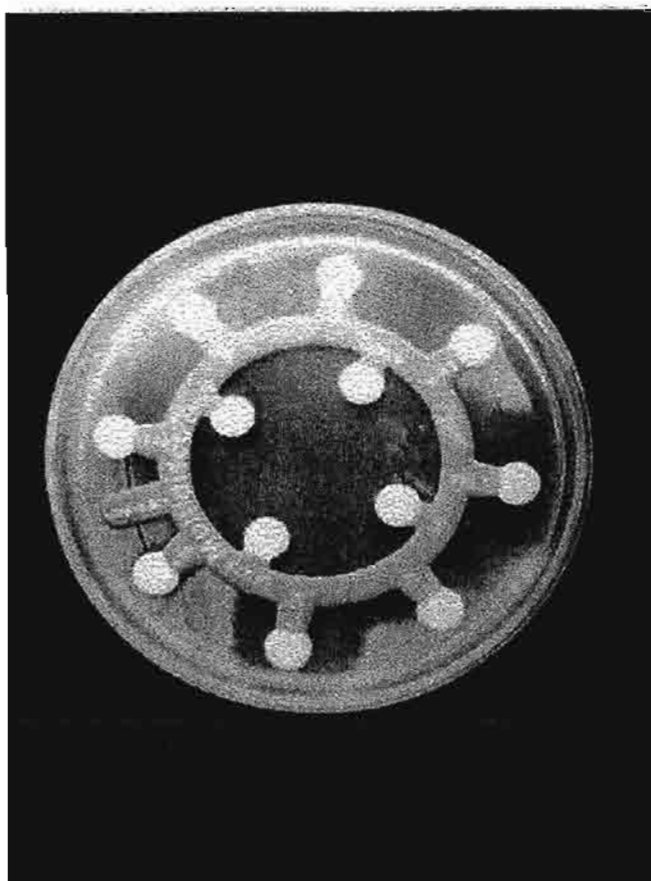


Figura 6. Resistencia a antibióticos (Multidiscos Sanofi).

De las 82 cepas de *A. hydrophila*, *V. fluvialis* y *V. furnissii*, que fueron sometidas a curación de plásmidos con naranja de acridina y posteriormente sembradas en agar sangre, 81 no crecieron en agar sangre, incluyendo todas las cepas de colección mencionadas anteriormente (Figura 7). De la misma forma después de ser sembradas en agar de Müller y Hinton, posterior a la curación de los plásmidos, tampoco presentaron halos de inhibición para ningún antibiótico

empleado. De la misma forma ninguna de estas cepas registró presencia de plásmidos en la corrida de gel de agarosa efectuada después de su exposición en naranja de acridina (Figura 8). Para eliminar la posibilidad de que el proceso de expulsión de los plásmidos hubiera afectado la capacidad de las bacterias de multiplicarse, las cepas contenidas en los tubos de caldo de LB se sembraron nuevamente en agar de BHI, obteniéndose crecimiento en todas ellas.

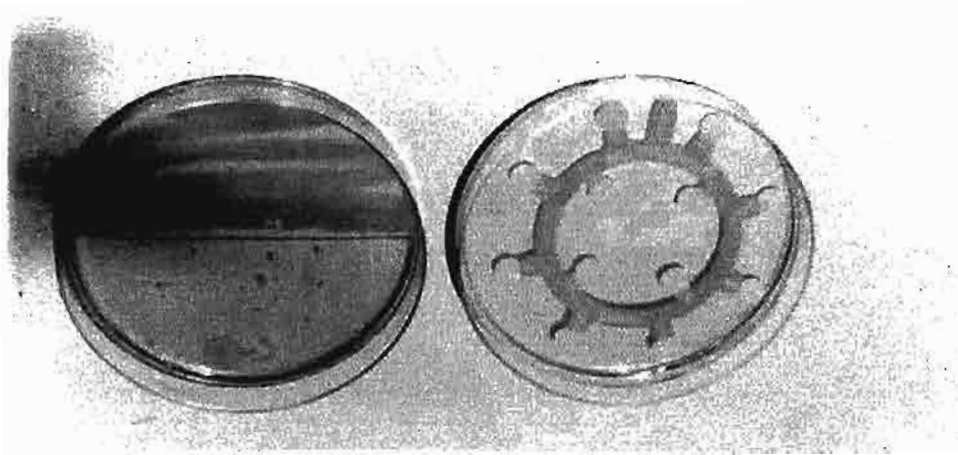


Figura 7. a) Crecimiento comparativo en agar sangre antes y después de tratar los plásmidos con naranja de acridina. b) Sensibilidad a antibióticos después de curación de plásmidos.

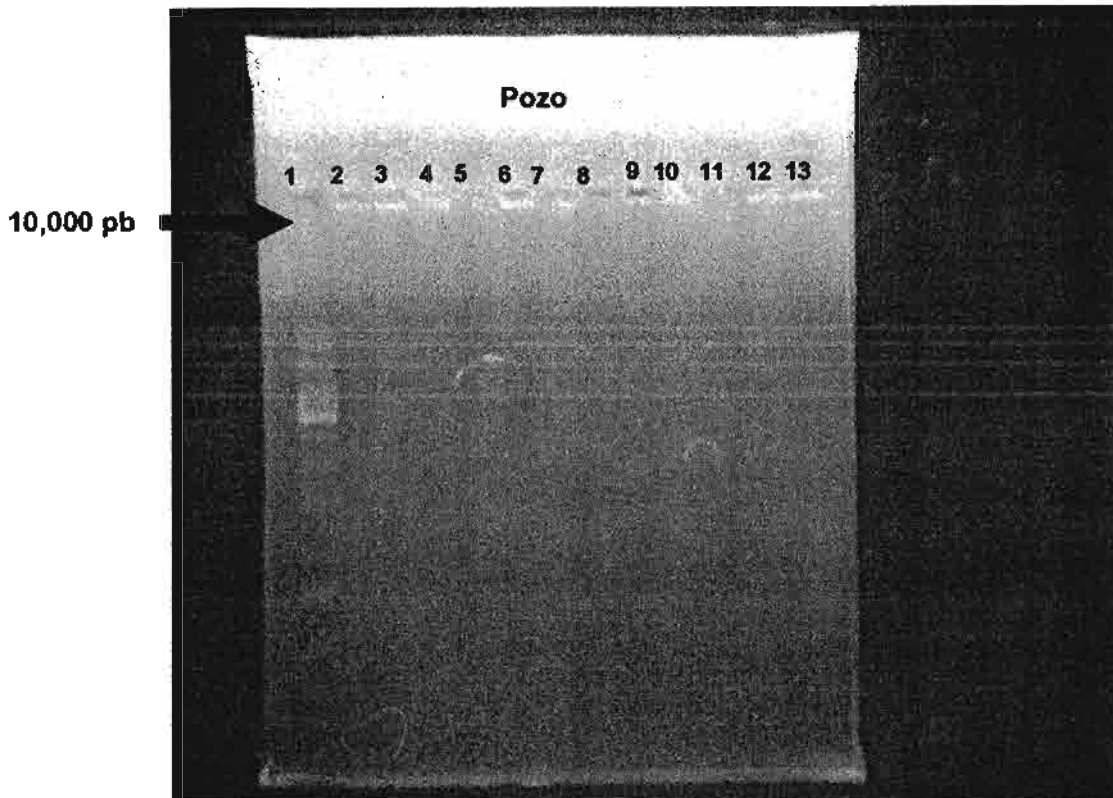


Figura 11. Comprobación de ausencia de plásmidos, después del tratamiento con naranja de acridina.

Determinación de la capacidad de *A. hydrophila*, *V. fluvialis* y *V. furnissii*, para donar plásmidos por conjugación.

Ninguna de las cepas de *E. coli* consideradas como receptoras de plásmidos que resultaron lactosa positiva, presentaron crecimiento después de ser sembradas en medio de agar de Müller y Hinton, con 2.5 mg/mL de Kanamicina.

DISCUSIÓN

El creciente interés en el acuarismo como empresa familiar que permite el incremento del ingreso familiar, está llevando a la creación en forma improvisada de granjas rústicas, sin el seguimiento de acciones preventivas sanitarias ni prácticas de higiene y limpieza adecuadas. Las medidas preventivas sanitarias no se practican en las granjas acuícolas que se estudiaron, carecen además, de medidas de higiene y limpieza en general (Contreras, 1988; Piper, 1992).

El tipo de acuicultura de estanquería rústica que se practica en las granjas estudiadas, como se mencionó anteriormente, presentaron condicionantes ambientales, biológicas y de explotación para que se manifieste el proceso infeccioso en proporciones importantes. Esto se deduce en la disposición de los elementos presentes en el modelo clásico, marcando un desequilibrio en este caso entre la relación patógeno-hospedero-ambiente propuesto por Sniezsko (1973), que llevará a la alteración de la relación salud-enfermedad con elevadas probabilidades de epizootia, al presentarse patógenos virulentos, bacterias de diferentes grupos con importancia ictiopatógena ya conocida, junto con el hospedador susceptible. Los peces en cultivo estudiados manifestaron signos y lesiones generales de infección, en un ambiente que no cumple con las condiciones biológicas, de manejo y de explotación adecuadas (Roberts, 1993).

La carga bacteriana identificada de las muestras extraídas de los tres ambientes analizados: agua de los estanques, alimento para peces y riñón de los peces, son el reflejo de la contaminación de bacterias del ambiente al que se encuentran los sometidos los organismos en cultivo (Inglis *et al.*, 1994).

El cuidado y manejo de los organismos, junto con la calidad de agua de los estanques son parte integral de las actividades de un centro acuícola, no obstante, es allí en donde se encontraron las mayores deficiencias, siendo los organismos

por éstas mismas razones más susceptibles al ataque de los patógenos (Inglis *et al.*, 1993).

La presencia de patógenos en el agua, indica el aporte de desechos agropecuarios y de asentamientos humanos irregulares, manifestando las carencias de las condiciones sanitarias en el manejo de las granjas acuícolas que forman parte de este estudio. De esta forma, las áreas de agua dulce están fuertemente contaminadas, por lo que se registraron los más altos conteos a 37 °C, debido a la presencia de bacterias coliformes (Negrete y Romero, 1998a).

Los resultados también demostraron que el mayor número de bacterias de las muestras de agua de los estanques y organismos, son obtenidos cuando se cultivó en placa de agar de BHI, ya que es un medio que provee el crecimiento general no selectivo para las bacterias, a diferencia del medio TCBS, que al ser altamente selectivo, favorece el crecimiento de especies ictiopatógenas como *Vibrio* y *Aeromonas*.

La variación en los resultados que se obtuvieron de la carga bacteriana, pudieron deberse a diversos factores, dependiendo de los microorganismos y del método de conteo utilizado, así por ejemplo, células bacterianas de formas pequeñas, no cultivables, pero si observables pueden ser contadas con el microscopio de epifluorescencia. Las diferencias entre el conteo directo y de placa pueden reflejar la simplificación de la selectividad del medio y de las condiciones de incubación usadas, proporcionando condiciones especiales a diferentes grupos fisiológicos y especies particulares en la muestra. La determinación de la biomasa bacteriana por medio del conteo directo en el microscopio de epifluorescencia, es aplicable a una variedad de hábitat sin llevar a cabo el procedimiento del conteo en placa (Atlas y Barta, 1992).

Por otra parte, el uso de filtros de nucleopore de policarbonato (Zimmermann y Meyer-Reil, 1974) en el microscopio electrónico de barrido, son mejores que el filtro de celulosa para el conteo directo de bacterias, debido a que éstos tienen un tamaño de poro de 0.2 μm uniforme y una superficie plana que retiene las bacterias en la superficie del filtro (Hobbie *et al.*, 1977); esto puede ser demostrado usando el microscopio de epifluorescencia y el microscopio electrónico de barrido (Zimmermann, 1977).

Las razones de la diferencia de la biomasa entre los métodos utilizados para el conteo, pudieron deberse a que las bacterias se encontraban en distintas etapas de su ciclo celular al efectuarse la preparación (Montesinos *et al.*, 1983).

En los tratamientos posteriores, las células bacterianas fueron deshidratadas con alcoholes del 80% absoluto, a punto crítico de secado (CPD) y algunas fueron teñidas con naranja de acridina y puestas en acetona durante 24h antes de ser separadas a punto crítico con CO_2 .

Es imposible predecir, cómo las células bacterianas responden a diferentes tratamientos, el efecto puede presentar una variación entre la estimación de biomasa obtenida por diferentes métodos (Bratbak, 1985). Sin embargo, la carga bacteriana en los sistemas de cultivo estudiados sobrepasan los límites permisibles que marcan las normas, sometiéndolos a riesgo constante de infecciones que pueden presentarse a nivel de epizootias, al variar en cualquier momento las condiciones ambientales del sistemas, conjuntamente con las inadecuadas condiciones sanitarias de manejo de las granjas.

El cuadro clínico que manifestaron los peces que fueron extraídos de los estanques, correspondió a las respuestas arquetípicas establecidas por Roberts (1993) de septicemia y de dermonecrosis focal, la cual está particularmente asociada con bacterias Gram (-) agresivas, reconocidas principalmente por la

presencia extendida a todos los órganos del individuo infectado, exoftalmia con edema periorbital y puntos hemorrágicos.

Las bacterias aisladas en el presente estudio, que se asocian tradicionalmente con el cuadro clínico anteriormente descrito son en principio: *Aeromonas* y *Vibrio*.

Se aislaron e identificaron *Aeromonas* no-móviles y móviles, las cuales se encuentran genéticamente relacionadas (Mc Innes *et al.*, 1979). Entre las primeras se identificaron: *Aeromonas salmonicida salmonicida* y *A. salmonicida mausocida / achromogenes*, dado que en la base de datos del API-20NE aparece esta agrupación de las *Aeromonas* no- móviles, coincidiendo con la propuesta de McCarthy y Roberts (1980), pero sin incluir el tercer grupo: *A. salmonicida nova*. Aunque Mc Innes *et al.* (1979), consideran que el grupo de *Aeromonas* no- móviles es un grupo homogéneo, por lo que la división entre estos tres grupos no es necesaria dada la alta homología entre el DNA de los tres subespecies propuestas; 95-106%, coincidiendo con las conclusiones de Popoff y Lallier (1984), respecto a la relación serológica entre los miembros de este grupo.

Las especies de *Aeromonas* móviles identificadas en el presente trabajo e incluidas en la base de datos del API-20E, fueron: *Aeromonas hydrophila* grupo 1, *A. hydrophila* grupo 2 y en el API-20NE se incluyen únicamente *A. hydrophila/caviae* y *A. sobria*. Esta división de *Aeromonas* móviles corresponde a la propuesta por Popoff y Veron (1976), quienes reconocen dos especies de *Aeromonas*: *A. caviae* (referida como *A. hydrophila* biotipo *anaerogenes*) y *A. sobria*.

Aunque Fanning *et al.* (1985) después de que realizan la hibridación con representantes de todos los grupos híbridos de ADN, definidos por Popoff (1981), confirma que todas las cepas de *Aeromonas* están cercanamente relacionadas y que las *Aeromonas* móviles podrían estar divididas dentro de por lo menos 10

diferentes grupos de ADN hibridado, coincidiendo con la clasificación del grupo de *Aeromonas* que reporta Farmer *et al.* (1999), en donde se registran: como *Aeromonas* no-móviles: *A. sal. salmonicida*, *A. sal. achromogenes* y *A. sal. masoucida*, *A. sal. smithia* y *A. media*; como *Aeromonas* móviles: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. schubertii*, *A. sobria*, *A. eucrophila* y *A. veronii*.

Aeromonas salmonicida, ha sido asociada con enfermedades infecciosas en organismos acuáticos reconocidas como furunculosis y con infecciones intestinales en pacientes humanos.

Aeromonas sobria, *A. hydrophila* y *A. caviae* han sido aisladas de diferentes especies de organismos acuáticos como langostinos de agua dulce, ranas, caracoles y caimanes; con signos de septicemia bacteriana (Gibbs, 1963; Head 1969; De Figuereido y Plumb, 1971; Shotts *et al.*, 1972), y se les ubica como patógenos oportunistas (Popoff y Veron, 1976).

En conclusión, este género ha sido tradicionalmente ubicado dentro de la familias *Vibrionaceae*, sin embargo, como resultado de estudios de genética molecular y dada su importancia como grupo de especies patógenas de organismos acuáticos, Colwell *et al.* (1986), proponen sea removido de esta posición para ubicarlo como una familia independiente: *Aeromonadaceae*.

Sin embargo, especies de esta familia como *A. hydrophila*, puede ser confundida con especies de la familia *Vibrionaceae* como: *Vibrio cholerae* y *Vibrio fluvialis* (Kinkelin *et al.*, 1988; Farmer III *et al.*, 1999).

De esta manera en el presente estudio 41 y 37 de las cepas identificadas con el API-20E y con el API-20NE respectivamente, presentaron la posibilidad de ser *Vibrio fluvialis*, especie incluida dentro de la base del primero de las galerías comerciales más no así en el segundo.

Por tal motivo se decidió aplicar la segunda fase de identificación con pruebas complementarias, diseñadas con base principalmente de acuerdo a Lee *et al.* (1981) quienes reportan haber aislado bacterias, las cuales excepto por su halotolerancia son parecidas a las *Aeromonas*. Estas bacterias eran referidas tradicionalmente como *Aeromonas*-marinas por haber sido aisladas de ambientes estuarinos y conformaban el nombrado grupo F (Furniss *et al.*, 1977) y reconocidas como grupo EF6 por Huq *et al.* (1980), microorganismos que parecen intermedios entre *Aeromonas* y *Vibrio* por su parecido fenotípico con *Vibrio anguillarum*. Sin embargo, por un lado Lee *et al.* (1978) afirman que muy posiblemente el grupo EF6 era un nuevo grupo con dos subgrupos o variedades y por otro Seidler *et al.* (1981), al efectuar la comparación fenotípica y genotípica del grupo F manifiestan que éste está más relacionado con los *Vibrio* que con *Aeromonas* y proponen igualmente dos biovariedades, mismas que Lee *et al.* (1981) proponen dentro del grupo de *Vibrio* con el nombre de *Vibrio fluvialis* con dos biovariedades I y II aerógena y anaerógena presentes en ambientes acuáticos, la biovariedad I fue aislada por Lee *et al.* (1981) de muestras clínicas de pacientes con diarrea. Negrete y Romero (1998 a y b), la reportan como patógena de carpa común, *Cyprinus carpio* y comprueban experimentalmente su capacidad de provocar infección en ésta especie.

Como consecuencia de la identificación con pruebas complementarias, se comprueba la presencia de *Vibrio fluvialis* en 19 cepas procedentes de muestras de riñón del pez dorado, *Carassius auratus*, con signos y lesiones de infección en un principio descritos.

El grupo de 31 cepas que presentaron crecimiento diferente a *A. hydrophila* por su crecimiento en TCBS de colonias amarillas de 2-3 mm, con viraje del medio a amarillo, y en las diferentes concentraciones salinas (0%, 1%, 3%, 5% y 8%) probadas y diferentes a *Vibrio fluvialis* por producción de gas en rojo fenol, como

fuelle de glucosa, fueron identificadas de acuerdo con Brenner *et al.*(1983) como *Vibrio furnissii*.

La presencia de bacterias de los dos géneros *Aeromonas* y *Vibrio* se confirmó empleando la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, aunque, la presencia de dos especies diferentes de *Vibrio*: *V. fluvialis* y *V. furnissii*, no se estableció. Para lo cual se deberán diseñar oligonucleótidos que determinen más detalladamente la secuenciación de estas dos especies.

Al haber sido *V. furnissii*, aislado inicialmente junto con *Vibrio cholerae* de muestras clínicas de pacientes humanos con diarrea, no pudo ser asociada todavía con infecciones intestinales en humanos (Farmer *et al.*, 1999). Sin embargo, se puede considerar que el presente estudio es el primer reporte de esta bacteria como patógeno de peces de ornato, al haber sido aislado de muestras de riñón de individuos con signos lesiones y comportamiento característicos de vibriosis, igualmente no fue el único patógeno de peces aislado en las muestras, por tal motivo se tiene que comprobar experimentalmente la relación etiológica con este hospedero para poder asociarlo con infecciones bacterianas en organismos acuáticos.

Las especies de *Pseudomonas* aisladas en el presente trabajo e implicadas con infecciones de organismos acuáticos son: *P. fluorescens* asociada a *Oncorhynchus rhodurus* en Japón (Hatai *et al.*,1975), *P. putida* y *P. cepacia* ambas han sido reportadas como patógenos importante y de alto riesgo para cultivos acuáticos (Wakabayashi *et al.*, 1981; Negrete y Romero, 1998a). El agente casual de epizootias en enfermedades en el pez conejo (*Sigamurus rivulatus*) ha sido identificado como *P. putrefasciens* (Saeed *et al.*,1990), esta bacteria fue nombrada anteriormente *Shewanella putrefasciens* (Lee *et al.*, 1977; Colwell, 1985). La mayoría de las especies de *Pseudomonas* son usualmente asociadas con

condiciones de estrés ambiental e inapropiado manejo de la producción (Bullock y McLauhlin, 1970).

Una de las enterobacterias más importantes, desde el punto de vista de salud pública, es *Salmonella*, causante de graves infecciones intestinales en el ser humano, las especie de esta bacteria dependerá de la especie que infecte y de esto dependerá los serotipos así puede encontrarse serotipos de humanos, aves y puercos (LaMinor, 1981). El serotipo de la cepa de *Salmonella* aislada en el presente estudio no fue posible especificar, aunque bien podría corresponder a cualquiera de los anteriores, ya que se encontraban animales como vacas, caballos y puercos dentro de los estanques en donde se llevaron a cabo los muestreos y bien pudieron contaminar los estanques por fecalismo. El paso de aguas negras por las inmediaciones de estas granjas, bien pudo ser la fuente de contaminación por este patógeno.

Serratia plymuthica aislada también en las muestras fue reportada por Nieto *et al.*, (1990) en cultivos de trucha arco iris en España. Negrete y Romero (1998 a y b) la aíslan de cultivos de Cyprinidos y Salmonidos y la confirman como patógeno oportunista en condiciones inadecuadas de cultivo.

Los resultados de la inoculación experimental con cepas de *V. fluvialis* y *V. furnissii*, aisladas de peces infectados de *C. auratus*, demostraron claramente capacidad de efectos de patogenicidad y de virulencia por inyección intramuscular de diferentes dosis infectivas de los patógenos problemas en peces sanos.

Los signos y lesiones obtenidos experimentalmente replicaron los registrados durante la infección original presentada por los peces enfermos cultivados en las granjas analizadas, correspondiendo en ambas cepas a los síndromes de dermatomionecrosis ulcerativa focal y septicemia hemorrágica (Roberts, 1993), características de infecciones provocadas por *Aeromonas* y *Vibrio*.

La presencia de signos generales de bacteriosis en los peces del grupo control, fue consecuencia del choque mecánico que implicó la inyección con solución salina estéril. Se puede considerar que la manifestación de estos signos de infección en estos individuos, los cuales desaparecieron en un lapso de tiempo muy corto, fue como consecuencia de la disminución de defensas de los peces por el estrés experimental, que en presencia de bacterias que forman parte de la flora normal de los peces causó la proliferación de estas dentro de los individuos control, iniciándose la infección (Negrete *et al.*, 2002).

El cuadro clínico acusado por los individuos de los grupos 10^7 , 10^6 y 10^5 , inoculados con ambas bacterias, se caracterizó por la presencia de algunos signos de bacteriosis general: nado errático, respiración sobre la superficie de los acuarios y opérculos abiertos constantemente; lo indica un daño agudo en la vejiga natatoria, en las branquias y en el corazón, lo que obligó a los peces a subir a la superficie a captar burbujas de aire desarrollando un esfuerzo considerable para respirar; además de la presencia de moco en forma de largos filamentos en la zona anal, lo que está manifestando enteritis; la presencia de secreción excesiva de moco sobre el cuerpo esta activando mecanismo de defensa de primera línea contra la infección. Se puede considerar que el cuadro clínico corresponde a una septicemia hemorrágica por la hemorragia generalizada a todos los órganos internos, además de la presencia de petequias y forúnculos sobre el cuerpo y de los hilos de sangre en las aletas de los peces.

De acuerdo con los resultados obtenidos para otros cuadros clínicos por Roberts (1993), *Vibrio fluvialis* y *V. furnissii* pueden ser considerados como patógenos agresivos, la patología manifiesta por los peces puede ser asociada a una respuesta arquetípica de la respuesta septicemia hemorrágica. Este cuadro clínico puede ser asociado conjuntamente con dermonecrosis focal ulcerativa. Las lesiones son características de cuadros agudos de vibriosis y furunculosis. Misma que manifestaron los peces en cultivo.

Con base a las D_{50L} encontradas por diferentes autores (Michel, 1982; Munro, 1982; Austin y Austin, 1987) que han establecido ya intervalos de 10^6 ufc/mL para *A. hydrophila*, otros como Angka (1985) proponen $10^{4.5-5.5}$ para *A. hydrophila* y de 1.3×10^5 ufc/mL para *A. salmonicida*, Toranzo *et al.* (1983) obtuvo intervalos entre $10^2-3 \times 10^{4.5}$ ufc/mL para *V. salmonicida* y de Wiik *et al* (1989) registraron de 4×10^6 a 1×10^8 ufc/mL. Las dosis medias letales obtenidas experimentalmente en el presente estudio tanto para *V. fluvialis* como para *V. furnissii*, se puede conferir a las cepas estudiadas características de virulencia muy agresiva, y por lo tanto se les debe considerar patógenos de alto riesgo para organismos acuáticos. Lo anterior se fundamenta en el hecho experimental de haberse cumplido todos los postulados de Koch.

Las D_{50L} obtenida, fue equivalente a 45,000 ufc/mL ($10^{4.5}$ ufc/mL) la cual en comparación con la dosis experimental obtenida por otros autores (Munro, 1982; Michel, 1982; Austin y Austin 1987) al obtener experimentalmente la D_{50L} de otras bacterias como *Aeromonas hydrophila* (10^6 ufc/mL), útica a *Vibrio fluvialis* y a *V. furnissii* como patógenos agresivos dado que la virulencia de una bacteria guarda relación inversa a la cantidad de ufc/mL del inóculo.

De los resultados de la segunda fase se puede inferir que estos vibrios, son patógenos que requieren de un hospedero vivo, y que no puede ser transmitidos vía el agua de los estanques, su trasmisión se lleva a cabo por contacto directo con el hospedero.

En conclusión, *Vibrio fluvialis* y *V. furnissii* deben de ser considerados como patógenos oportunistas de peces de ornato, como la carpa dorada, *Carassius auratus*, por lo que las condiciones sanitarias de manejo de esta especie deben mantenerse en estricta vigilancia, a riesgo de poder presentarse una epizootia en cualquier momento debido a su presencia en el tipo de granjas piscícolas, como las descritas en el presente estudio.

Se obtuvieron los perfiles de resistencia y plásmidos, tanto de las cepas que procedían de agua y del riñón de los peces (Watanabe *et al.*, 1971; Hayashi *et al.*, 1982), así como también del alimento balanceado (Davis y Hayasaka, 1983; Hastings y McKay, 1987), sin establecerse ninguna asociación especial con alguna.

Dentro de la variedad de antibióticos utilizados en el presente estudio, los que han recibido mayor acogida en la acuicultura, al menos en la zona que abarcó este estudio, y por el número de cepas que manifestaron resistencia a estos antibióticos son; cefalotina, ampicilina, nitrofurantina, tetraciclina, cloranfenicol, kanamicina y carbenicilina. Se desconoce, sin embargo, la sensibilidad de las mismas bacterias a una gran variedad de los antibióticos empleados en este estudio.

En *A. hydrophila* se obtuvieron plásmidos en un intervalo de 6.6 kb a 22.5 kb coincidiendo, con Son *et al.* (1977), sin embargo, Chang y Bolton (1987) y Chaudhury *et al.* (1996) reportan plásmidos de intervalos desde 85.6 kb a 159 kb para cepas de la misma especie. Los plásmidos obtenidos de cepas de *Vibrio fluvialis* y *V. furnissii*, registraron pesos moleculares mayores de intervalos de 15 kb – 6.9 kb, que los reportados por Giles *et al.* (1995) para *V. anguillarum*. Lo anterior indica que el plásmido-R que media la resistencia tanto en *A. hydrophila*; (Son *et al.*, 1977), como en *V. fluvialis* y *V. furnissii* son de peso variable.

Se puede relacionar mayor diversidad en los pesos moleculares de los plásmidos en las cepas de *A. hydrophila*, así mismo pesos moleculares menores fueron de *V. fluvialis* y *V. furnissii*.

Las cepas de colección empleadas en el presente trabajo presentaron únicamente un plásmido de peso molecular muy alto, 25.7 kb, a diferencia de los reportados

por Giles *et al.* (1995), para las cepas de *A. salmonicida* (ATCC33658) y *V. ordalii* (ATCC33509), que presentaban varios plásmidos de bajos pesos moleculares.

La presencia de resistencia a antibióticos en todas las cepas y un alto porcentaje de éstas, en siete de los antibióticos probados, nos indica la aplicación del control químico por antibióticos, desconociendo por parte de los acuicultores la especificidad del patógeno que esta infectando al cultivo, la especificidad del antibiótico necesario para controlar al agente causal y o la dosis necesaria. Intentando fallidamente el uso de un antibiótico tras otro. Obteniendo al final un lote de peces infectados crónicamente, portadores de bacterias resistentes a la mayoría de los antibióticos comercialmente más empleados y un ambiente contaminado de químicos, que inducirán a la formación de plásmidos resistentes de las bacterias que se encuentren en ese espacio ambiental, y que puedan ser patógenas para otras especies incluyéndose al ser humano.

La práctica del uso de antibióticos como medida de control de infecciones en la acuicultura, por otro lado, no es redituable, ya que al ser ésta una empresa requiere abatir costos y el precio del alimento ya medicado incrementa estos a un nivel que no es conveniente desde el punto de vista de ganancias en venta.

La presencia de más de un plásmido, indica el empleo de más de un antibiótico en el intento de controlar la infección detectada en los lotes de peces empleados en este estudio. Por otro lado, también es un indicador de que a la granja en donde se efectuó el muestreo ingresaron lotes diferentes de peces, por la diferencia de los plásmidos extraídos, sugiriendo que estos peces que ingresaron a la granja eran portadores de bacterias ya resistentes, y que al variar las condiciones ambientales se manifestaron como patógenos y recibieron nuevamente la dosis de diferentes antibióticos.

Los plásmidos obtenidos en el presente estudio presentaron incapacidad de establecer transferencia a *E.coli*, no perteneciendo, por tanto, a ninguno de los grupos C o U de incompatibilidad (Hedges *et al.*, 1985).

Sin embargo, son necesarias, restricciones legales en el uso de antibióticos para prevenir y controlar infecciones en la acuicultura, ya que contribuirían para disminuir la formación y dispersión de plásmidos-R en otras especies que si presentaran tal capacidad. Todos los plásmidos extraídos de las cepas de *Pseudomonas*, presentaron en común, la presencia de plásmidos de intervalos de 3,000 pb, 18,000 pb y 16,363 pb, lo que comprueba que las bacterias recibieron un antibiótico en común.

Los marcadores de las cepas *E. coli*, HB 101, R 27 y RP 24, que presentaron pesos moleculares: 143 MDa, 112 MDa y 136 MDa respectivamente, los que corresponde a 5,000 pb, 3,920 pb y 1,260 pb, trazaron una curva dentro de la cual los pesos moleculares y el logaritmo de la movilidad relativa de los plásmidos problema, no fue posible interpolar debido a que sus pesos moleculares son demasiado elevados, quedando todos entre los intervalos desde 3,157 pb hasta 30,000 pb.

El hecho de haber encontrado plásmidos de pesos moleculares altos de 3,157 pb a 16,363 pb, indica la exposición de los organismos cultivados, de donde se aislaron las cepas bacterianas, a dosis y tipo de antibióticos de una forma indiscriminada, comparando con el plásmidos RP 24 el cual es resistente a kanamicina, estropmicina y ampicilina.

Estos pesos moleculares tan elevados, pueden corresponder a la presencia de plásmidos de forma circular covalentes (CCC). Plásmidos de pesos moleculares intermedios pueden corresponder a cadenas abiertas (OC), las de

menores pesos moleculares indicarian la presencia de plásmidos de cadenas lineales abiertas (COL) o incluso a dímeros de ellas (Cohen *et al.*, 1999).

La obtención de multiplásmidos en cepas bacterianas aisladas de riñón de organismos acuáticos cultivados en granjas acuícolas, sugiere el uso indiscriminado de antibióticos de diferente tipo y en dosis elevadas, como estrategia terapéutica preventiva de infecciones bacterianas, en estos cultivos.

Las familias de *Aeromonas* y de *Vibrio* integran un grupo complejo de patógenos tanto para el humano como para diferentes especies acuáticas, tanto de vida natural como en cultivo. Por tanto, es importante efectuar estudios tanto de etiología como de epidemiología de estas especies para establecer si alguna de sus características fenotípicas puede ser relacionada con la virulencia. Algunas propiedades bioquímicas, enzimáticas y celulares han sido reportadas como indicadores potenciales de la virulencia en cepas de *Aeromonas*: Wakabayashi y Joseph (1981); Hsu (1981); Turnbull *et al.* (1984); Morgan *et al.* (1985); Angka (1985); Kaper *et al.* (1990), reportan que cepas virulentas de *A. hydrophila* obtenidas de tejido ulcerado del bagre de canal, *Ictalurus punctatus*, posee genes de hemólisis que son capaces *in vitro* de lisar células rojas de varias especies de animales. Esta actividad hemolítica se logró establecer en el presente estudio para las cepas de *V. fluvialis* y *V. furnissii*, las cuales al ser sembradas en agar sangre, formaron zonas verdosas-parduscas alrededor de las colonias bacterianas, indicando pérdida de potasio, por la actividad α -hemolítica de las cepas.

En *V. anguillarum* se ha demostrado el requerimiento de un plásmido PJM1 de 25-65 kbp para codificar el sistema componente de la virulencia (Crosa *et al.*, 1987 y 1989), así mismo, experimentos sobre infecciones bacterianas realizados por Wiik *et al.* (1985), en *A. salmonicida* indican que si la virulencia está mediada por plásmidos, el plásmido de 24 MDa es importante. Así mismo, en el presente estudio se encontró que las cepas virulentas de *V. fluvialis* y *V. furnissii*,

presentaban plásmidos con intervalos entre 15 kbp a 6.6 kbp y que las cepas del grupo de las *Aeromonas* analizadas, presentaron plásmidos-R de 25.7 kbp. Se encontró, además, que las cepas portadoras de estos, presentaron resistencia a los antibióticos cefalotina, ceftriaxina, cefataxina, carbecilina, kanamicina, tetraciclina, y ampicilina, estas tres últimas de uso común en la acuicultura.

La relación entre la presencia de plásmidos y la capacidad hemolítica de ambas especies bacterianas de *Vibrio*; entendida como factor de virulencia (Madigan, *et al.*, 2000), fue confirmada al desaparecer la capacidad de hemólisis de las cepas que pasaron por el proceso de curación de plásmidos, ya que las cepas que expulsaron los plásmidos no crecieron en agar sangre o bien no presentaron α hemólisis, además de que estas cepas tampoco presentaron halos de inhibición al efectuarse nuevamente el estudio de antibiograma para todos los antibióticos antes mencionados.

CONCLUSIONES

1. El tipo de acuicultura que se practica en las granjas piscícola estudiadas, se puede considerar rústica. Presentaron condiciones ambientales, biológicas y de explotación apropiadas para que se manifieste un proceso infeccioso de proporciones importantes. La disposición de los elementos: patógeno-hospedero-ambiente, considerados dentro del modelo clásico de la tríada ecológica y que desde el punto de vista de la sanidad acuícola definen el estado salud–enfermedad en los sistemas acuícolas, presenta una relación en desequilibrio tanto cuantitativa como cualitativamente, que llevará al proceso inclusive a niveles de epizootias.
2. Los ingresos de agua, alimento y organismos para cultivo en todas las granjas portaron carga bacteriana constituida por bacterias de alto riesgo para la acuicultura, como son los diferentes géneros identificados de las cuatro familias con representantes ictiopatógenos: Aeromonadaceae, Vibrionaceae, Pseudomonadaceae y Enterobacteriaceae. La presencia de especies entéricas pertenecientes a éstas dos últimas familias bacterianas indica aportes de desechos agropecuarios y humanos a los sistemas de producción acuícola.
3. Se identificó además de la especie bacteriana *V. fluvialis*, ya aislada sistemáticamente de muestreos de estudios previos, otra especie de la familia de los *Vibrio*: *V. furnissii* de la cual al igual que la anterior se desconocía su relación etiológica con el hospedero y por tal motivo no son consideradas dentro de las normas sanitarias mexicanas como especies notificables ni certificables.

4. La relación etiológica de estas dos especies *V. fluvialis* y *V. furnissii* con su hospedero en este caso el pez dorado *C. auratus*, fue comprobada experimentalmente por el cumplimiento, en ambos caso, de los postulados de Koch.
5. Ambas especies deben de ser consideradas como patógenos de alto riesgo para los sistemas acuícolas, al provocar infecciones agudas definidos dentro del síndrome de miodermonecrosis ulcerativa con septicemia, y poseer una D_{50L} de $1 \times 10^{4.5}$ ufc/mL.
6. Se comprobó el uso indiscriminado de antibióticos, como intento de control de infecciones en los sistemas de cultivo analizados, al obtener plásmidos-R en todas las cepas aisladas de los diferentes ambientes.
7. La presencia de plásmidos en este tipo de muestras lleva al problema al ámbito de la salud pública, por tratarse de muestras que proceden de organismos que entran en contacto directo con el humano, al ser manipuladas en el proceso de producción, comercialización y venta o bien como sus mascotas. Por otro lado al encontrarse en el agua para cultivo, que al ser liberada al ambiente, llega a otras zonas, poblados o granjas aledañas, a través del flujo natural de la misma.
8. Se comprobó que el factor de virulencia, entendido como la capacidad de hemolizar sangre, de las cepas de *A. hydrophila*, *V. fluvialis* y *V. furnissii*, está relacionado con la presencia de plásmidos.
Con fundamento en los puntos anteriores las bacterias *V. fluvialis* y *V. furnissii* deben de ser consideradas dentro de las normas oficiales mexicanas NOM-010-PESC, NOM-011-PESC y NOM-030-PESC y los proyectos de norma NOM-021-PESC y NOM-022-PESC, inclusive como

patógenos certificables, fundamentándose en: 1) el alto grado de patogenicidad y los cuadros infecciosos agudos y agresivos que provocan y 2) si bien estos microorganismos tienen tratamiento, los antibióticos, la presencia de plásmidos resistentes en la mayoría de las cepas bacterianas y a su relativa fácil transferencia de un microorganismos a otro inclusive entre microorganismos de diferente especie, hace ineficaz el uso de estos. Por lo tanto el monitoreo de vigilancia de los parámetros ambientales, las medidas zoonosanitarias para control y prevención del ingreso y dispersión de patógenos en los tres ingresos a las granjas deben implementarse de forma permanentemente. El uso de antibióticos incorporados al pienso que se suministra a los organismos cultivados se debe prohibir de una forma reglamentada. Al mismo tiempo que apoyar tratamientos alternativos para el control prevención e inmunoprotección de infecciones dentro de las granjas acuícolas.

9. La aplicación de diferentes técnicas de identificación bacteriológica a diferentes niveles tales como pruebas fenotípicas, bioquímicas y moleculares, para el diagnóstico y estudio de muestras de origen acuícola, originalmente diseñadas para el análisis de muestras clínicas, aportan información útil. Así la identificación general de las bacterias mediante pruebas del API-20E y API-20NE deben considerarse presuntiva

La estrategia de propuesta para identificación de bacterias dulce acuícolas, que se desprende del estudio efectuado sería: a) un primero y único aislamiento en medio selectivo que dependiendo del tipo de muestra, así por ejemplo: de origen piscícola o semejantes agar de TCBS y b) la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

10. Los puntos anteriormente expuestos reflejan un campo de acción desprotegido dentro de la acuicultura, dado que se carece de profesionales

que estén capacitados para el diseño normas sanitarias más acordes con la realidad en el manejo de las granjas acuícolas mexicanas y la observancia de las normas en los diferentes puntos de aplicación: sitios de movilización (importación y exportación), centros de reproducción y cultivo y centros de comercialización y venta de especies acuícolas, suministros y piensos.

LITERATURA CITADA

- Acerbi, E. Dotrina teorico-práctica del morbo petechiale con nuovo ricerche intorno l' indole cagioni predisponenti ed effetrici, la cura e la preservazione del morbo medesino in particolare e degli altri contagi in generale, Milano.1822.
- Altewegg, M., Steigerwalt, A. G., Altewegg-Bissig, R., Luthy-Hottenstein J. y Brenner, D.J. Biochemical Identification of *Aeromonas* Genospecies Isolated from Humans. *American Society for Microbiology*.1990;28 (2):258-264.
- Analytical Profile Index Enterobacteriaceae and other Gram negative bacteria, 4^a Edition BioMerioux, France.1989 .
- Analytical Profile Index Enterobacteriaceae and other Gram negative bacteria, 4^a Edition BioMerioux, France.1999.
- Angka, S.L. The pathology of the walking catfish *Clarias batrachus* (L.) infected intraperitoneally with *Aeromonas salmonicida*.1985.
- Aoki, T., Egusa, S., Kimura, T. y Watanabe, K. Detection of R factors in naturally occurring *Aeromonas salmonicida* strains. *Applied of Microbiology*. 1971; 22:716-717.
- Aoki, T., Kitao, T. y Kawano, K. Changes in drugs resistance of *Vibrio angullarum* in cultures ayu, *Plecoglossus altivelis*. Temminck and Schlegel, in Japan . *Journal of Fish Diseases*.1981;4: 223-230.
- Aoki, T., Kitao, T., Lemura, Y., Mitoma, Y. y Nomura, T. The susceptibility of *Aeromonas salmonicida* strains isolated in cultures and wild salmonids to variouschemotherapeutics. *Bulletin Japanese Society of Sciences*. Fish. 1983; 49 :17-22.
- Aoki,T. Tecnology of antibiotics resistents determinants of r plasmid from fish pathogenic bacteria. Fifth international Symposium of Microbiology Ecology. 1989;8:27-991.
- APHA. Standard methods for examination of water and wastewater.14th. Ed. American Public Health. Washinton, D.C. 1992.
- Atlas, R. M. y Bartha, R. Microbial ecology fundamentals and applications.Third /Cummings Publishing Company,INC. 1992;178-189.

- Austin, B. y Austin, D. A. Bacterial fish pathogen diseases in farmed and wild fish. Ellis Horwood Ltd. England. London, England. 1987.
- Austin, B. y Austin, D. A. The pathogenicity of *Vibrio* type strains to salmonids. Dep. Biol. Sci., Heriot-Watt Univ., Riccarton, Edinburgh, EH14 4 AS, UK. International Symposium on Aquatic Animal Health, Seattle, USA, 1994;4-8.
- Bacteriological Reviews 1900 - 1991.
- Barnabé, G. Acuaculture. Barcelona Ed. Omega. 1991.
- Barry, Al. y Thomsberry, C. Susceptibility test by diffusion test procedures. In E: Lennette (Ed.) Manual of Clinical Microbiology. 4th Ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C. 1985;978-979.
- Bast, L., Daly, F.G., De Grandis, S. A. y Stevenson, R. M. W. Evaluation of profiles of *Aeromonas salmonicida* epidemiological markers of furunculosis infection in fish. Journal of Fish Diseases. 1988;11:133-145.
- Bauer, A., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C. y Tenckhoff, M. Antibiotic susceptibility by a standard single disk method. American Journal of Clinical Pathology. 1966;36:493-496.
- Berheim, A. "Contagion". Dictionnaire encyclopédique de sciences médicale. Paris, 1877;XX:1-60.
- Biological Abstracts. 1980 – 1990.
- Birnboim, H. C. y Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for cloning recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Reviews. 1979;7:1513-1517.
- Bratbak, G. Bacterial biovolume and biomass estimations. Applied Environmental Microbiology. 1985;49:1488-1493.
- Brenner, D. J., Hichman-Brenner, F. W., Lee, J. V., Steigerwalt, A. G., Fanning, G. R., Hollis, G. G., Farmer III, J. J., Weaver, R. E. y Seidler, R. J. *Vibrio furnissii* (formerly aerogenic biogroup of *Vibrio fluvialis*), a new species isolated from human feces and the environment. Journal of Clinical Microbiology. 1983;18:816-821.
- Brittan, F. Report of a series of microscopical investigations on the pathology of cholera, Lond : Gaz., 1849;IX: 530-542

- Budd, W. Malignant cholera, its mode of propagation and its prevention, London. 1849.
- Bulloch, W. The history of bacteriology. New York .1938.
- Bullock, G. L. y Mc Laughlin, J. J. A. Advances in the knowledge concerning bacteria pathogenic to fishes (1954-1986 pp). En: S.F. Snieszko (Comps.). A Symposium on Diseases of Fishes and Shellfish. American Fisheries Society Special Publication, 5. Washington . D.C. 1970.
- Cappuccino, J. G. y Sherman, N. Microbiology a laboratory manual. Fourth edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company. NC. 1996;27:28:115-119.
- Cisar, J. O. y Fryer, J. L. An epizootic of vibriosis in *Chinook salmon*. Bulletin Wildlife Diseases Association. 1969;5:73-76.
- Coleman, A.W. Enhanced detection of bacteria in natural environments by fluorochrome staining of DNA. Limnology and Oceanography.1980;25: 948-951.
- Colwell, R. R. y Grimes, D. J. *Vibrio* diseases of marine populations. Helholand. Meeresunters. 1984;73:73-76.
- Colwell, R. R. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered. Microorganisms. Biotechnology 1985;3:817-820.
- Colwell, R. R. Vibrios in the environment . John Wiley and Sons, New York 27. 28. Colwell, R.R., Mc Donnell, M.T., De Ley, J. Proposal to recognize the family Aeromonadaceae. Fam. nov. International Journal of Systematic Bacteriology. 1986;36:473-477.
- Cohen, D. y Clewell, D. Hollander J (ed). Plasmid In Plenum Press. New York. 1999.
- Contreras, L. E. Manual de prevención de enfermedades que afectan a los organismos en cultivo. Secretaría de Pesca. 1988.
- Coquerelle, J. Bretonneau (1778-1862). La doctrine spécifique, ses origines et son evolution, Paris 1869.
- Conte, J. E. Manual of antibiotics and infectious diseases 8a ed. . Williams and Wilkins. Baltimore. 1995.

- Cowan, S. T., Cowan y Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria 2nd ed. Cambridge:Cambridge University Press. 1974.
- Crosa, J. H, Schiewe, M. H. y Falkow, S. Evidence for plasmid contribution to the virulence of the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. Infectology and Immunology. 1977;18:509-513.
- Crosa, J. H., Hodges, L. L. y Schiewe, M. Curing of plasmid is correlated with attenuation of virulence in marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* . Infectology and Immunology. 1980;27:897-902.
- Crosa, J. H. A plasmid associated with virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* specifies an iron sequestering Systematic Nature (London) 1980;284:566-568.
- Crosa, J. H., Actis, L. A., Mitoma, Y., Perez-Casal, J., Tolmasky, E. y Valvano, M. A. Plasmid-mediated iron sequestering systems in pathogenic strains of *Vibrio anguillarum* and *Escherichia coli* 1989.1987. In D.R. Helinski, S.N. Cohen, D.Clewell, D. Jackson, and A. Hollaender (ed). Plasmid in bacteria Plenum Press, New York.
- Chang, B. J. y Bolton, S. M. Plasmid and resistance to antimicrobial agents in *Aeromonas sobria* ND *Aeromonas hydrophila* clinical isolates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1987;3:1281-1282.
- Chaudhury, A., Nath, G., Shukla, B. N. y Saval, S.C. Biochemical characterisation, enteropathogenicity and antimicrobial resistance plasmid of clinical and environmental *Aeromonas* isolates. Journal of Medical Microbiology 1996;44:434-437.
- Davis, J. F. y Hayasaka, S. S. Pathogenesis bacteria associated with cultured American eels. Journal of Fish Biology.1983;23:557-564.
- Davis, J. Interspecific gene transfer in nature and in the laboratory. Fate of engineered microorganisms in the environment .Recent advances in microbial ecology. Proceedings of the 5th International Symposium on Microbial Ecology. 1990.
- Dalsgaard, I., Gudmundsdottir, B. K., Helgason, S., Hoie, S., Thoresen, O. F, Wichardt, Y. y Wiklund, T. Identification of atypical *Aeromonas salmonicida*: inter-laboratory evaluation and harmonization of methods. Journal of Applied Microbiology. 1998;84:999-1006.

- Egvidius, E., Wiik, R., Andersen, K., Hoff, K. A. y Hjeltnes, B. *Vibrio salmonicida* sp. nov., a new fish pathogen. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1986; 36:518-520 .
- Egvidius, E. *Vibriosis: Pathogenicity and Pathology. A review. Aquaculture*. 1987;67: 15-28.
- Emmerich, R. y Weibel, E. Ueber eine durch bakterien erzeugte Seuche unter den Forellen. *Archives für Hygiene und Bacteriologie*.1894; 21:1-21.
- Fanning, G. R., Hickman-Brenner, F. W., Farmer III, J. J. y Brenner. D.J. DNA relatedness and phenotypic analysis of the genus *Aeromonas* . Abstract C116, p. 319. In: Abstract in the Manual Meeting of the American Society for Microbiology. ASM, Washington. 1985.
- Farmer III, J. J., Arduino, M.J. y Hickman-Brenner, F. W. The Genera *Aeromonas* and *Pleisomonas*. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* . Williams and Wilkins. Baltimore 1999;159:3012-3215.
- Figueredo, De J. y Labarta, J. U. Virulence of different isolated of *Aeromonas hydrophila* in channel catfish. *Aquaculture*. 1968;11:349-354.
- Figueredo, De y Plumb, J. A. Virulence of different isolated of *Aeromonas hydrophila* in channel catfish. *Aquaculture*.1971;11:349-354.
- Fildes, P. y Mc Intosh, J. The aetiology of influenza, *British Journal of Experimental Pathology*. 1920;1:119-126.
- Furniss, A. L., Lee, J. V. y Donovan, T. S. Group F, a new vibrio?.*Lancet* 1977;II: 565-566.
- Gene Ruler™ MBIFERMENTAS kb.DNA. Ladder. *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*. Vol. 1 (Ausubel,F.M., et al., ed.)John Wiley & Sons, Inc., Brooklyn, New York. 3.0.1-3.02. 1997.
- Gibbs, E. L. An effective treatment for red-legs diseases in *Rana pipper* Laboratory Animal, *Care*.1963;13:781-783.
- Giles, J. S., Hariharan, H. y Heaney, B. S. The plasmid profiles of fishPathogen isolates of *Aeromonas salmon icida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii* from the Atlantic and Pacific coasts of Canada. 1995;41:209-216.

- Giono, C. S. Prueba de Bauer-Kirby para sensibilidad a los antimicrobianos. *Infectología*. 1983; III:(7):325.
- Hasting, T. y McKay, A. Resistance of *Aeromonas salmonicida* to colicin acid. *Aquaculture* 1987;61:165-171.
- Hatai, K., Egusa, S., Nakajami, M. y Chikajata, K. *Pseudomonas* as a fish pathogen. *Bulletin of Japanese Society of Scientific and Fisheries*. 1975;41:1203-1207.
- Hayasi, F., Araki, Y., Harada, L., Inoe, M. y Mtsuhashi S. Epidemiological studies of drug resistance strains in cultured fish and water. *Bulletin of Japanese Society of Sciences and Fisheries* 1982; 48:1121-1127.
- Hawke, J. P., McWhorter, A. C., Stergerwalt, A. G. y Brenner, D. J. *Edwardsiella ictaluri* sp. nov., The causative agent of enteric septicemia of catfish. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1981;3(14):396-400.
- Head, A. R. *Aeromonas hydrophila* in leukoderma syndrome of *Achatina fulica*. *Malacologia*, 1969;9:43.
- Hedges, R. W. y Datta N. R-factors giving chloramphenicol resistance. *Nature*, London 1971;234:220-221.
- Hedges, R. W., Smith, P. y Brazil, G. Resistance Plasmid of Aeromonadacea. *Journal of General Microbiology*. 1985;131:2091-2095.
- Hindler, J. Antimicrobial susceptibility testing. In H.D. Isenberg (ed.). *Clinical Microbiology procedures Handbook*. American Society of Microbiology. Washington, D.C. 1992;5.1-5.19.
- Hobbie, J. E., Daley, R. J. y Jasper, S. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescent microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*. 1977; 33:1225-1228.
- Hsu, T. C. Correlation of extracellular enzymatic activity and biochemical characteristic with regard to virulence of *Aeromonas hydrophila*. *Developmental Biological Stand.* 1981;49:101-111.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Daley, J. T. y Williams, T. S. *Bergey's Manual of determinative bacteriology*, 9th Ed. Williams & Wilkins, Baltimore . Md. 1994.

- Huq, M. I, Alam, A. K., Brenner. D. J. y Morris G. K. Isolation of Vibrio-like group, EF-6, from patients with diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology* 1980;11:621-624.
- Inglis, V, Roberts, R. J, y Bromage, N. R. Bacterial diseases of fish. Instituto de Acuicultura. Toronto Canadá.1994.
- Jiménez, G, F. y Galavis, S. L. Parásitos y enfermedades del bagre(*Ictalurus spp*) Secretaria de Pesca 1986.
- Kaper, J, Lockman, B. y Colwell, H. *Aeromonas hydrophila* Asian Fisheries Sciences.1990;3:343-351.
- Kimura, T. Studies on a bacterial diseases occurred in the adult "Sukuramasu" (*Oncorhynchus masou*) and pink salmon (*O. gorbuscha*) rearing for maturity. Scientific reports of Hokkaido Salmon Hatchery 1970;24:9-100.
- Kimura, M. y Kitao, T. On the etiological agent of "bacterial tuberculosis"of seriola. *Fish. Pathol.* 6; 8-145. Kimura, T. Studies on a bacterial diseases occurred in "Sukuramarasu" (*Oncorhynchus masou*) and pink salmon (*O. gorbuscha*) rearing for maturity. Scientific reports of Hokkaido. Salmo Hatchery.1971; 24: 9-10.
- Khan, A. y Cerniglia, C. E. Rapid and sensitive method for the detection of *Aeromonas caviae* and *Aeromonas trota* by Polymerase Chain Reaction. *Aquaculture*.1977;24:233-239.
- Kinkelin, P., Michel, G. y Ghitino, P. Tratado de enfermedades de peces. Madrid. 1985; 53-117.
- Kottella, M. A. Cultive of ornamental fish. 1993.
- La Minor L. The genus *Salmonella*. En Starr, P.M., Stop, H., Tupper,H., Balows,G.H. y Scheler H.G. (Comps.). *The Prokaryotes. A Handbook Isolation and Identification of Bacteria. Vol.II*, Springer-Verlag, Berlin. Heidelberg. New York. 1981;1259-1269.
- Lee, J. V., Court, P., Donovan, T. J. y Furniss, A. L. Taxonomic significance of the MIC of the vibriostatic compound O/129 and other agents against the Vibrionaceae. *Journal of Applied Bacteriology*. 1977;45:VIII.
- Lee, J. V. Donovan T J, Furniss A L. Caracterización and emended description of *Vibrio metschnikovii*. *International of Systematic Bacteriology*.1978;28:9-11.

- Lee, J. V., Shread, P., Furniss, A. L, y Bryant, T. N. Taxonomy and description of *Vibrio fluvialis* sp. Nov.(Synonym. Group F.Vibrios EF6) Journal of Applied Bacteriology. 1981;50:73-94.
- Litchfield, C. D. Marine Microbiology(ed) por C:L: Litchfield Dowden. Hutchinson.1976.
- Love, M. T., Teebeken-Fisher, D., Hose, E.J., Farmer, J. J., HickmanIII, F. W. y Fanning, G. R. *Vibrio damsela* , a marine bacterium causes skin ulcers on the damselfish *Chrimis punctipinnis*. Sciences, 1981;214:1139-1140.
- Madigan, T. M., Martinko, M. J. y Parker, J. Biología de los Microorganismos, Prentice Hall. Iberia, Madrid. 2000.
- Marxs, C. F. H, Origines contagii Caroliruhae et Badae,1824.
- Mc Carthy, D. M. Fish furunculosis caused by *Aeromonas salmonicida* var. *achromogenes*. Journal of Wildlife Diseases. 1975;11:489-493.
- Mc Carthy, D. H. y Roberts, R. J. Furunculosis in fish. The present state of our knowledge. En M.R. Droop y H.W. Jannash (Comps.). Advances in aquatic Microbiology . Academic. Press. London.1980;289-291.
- Mc Graw, B. H. Furunculosis of fish U.S. Fish and Wildlife. Service Special Reports Fish. 1952;84- 87.
- Mc Innes, J. H, Trust, T. J. y Crosa, J. M. Deoxyrobonucleic acid relationship among the genus *Aeromonas*. Canadian Journal of Microbiology. 1979;25:579-586.
- Meyer, F. P. y Bulloch, G. L. *Edwarsiella tarda*, a new pathogen of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Applied Microbiology.1973; 25:155-156.
- Michel, C. A standardized of experimental furunculosis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) Canadian Journal of Fish Aquatic. Scienses.1980;37:746-750.
- Michael, C. Development of bacteria in fish water during a estandarized experimental infection of rainbown trout (*Salmo gairdneri*) with *Aeromonas salmonicida*. Microbial diseases of fish. Ed.R.J, Roberts.London, England. 1982;45-55.
- Mills, D. y Beber, G. Guía practica de los peces de acuario. Ed Blume Montagne 1995;1836.

- Montesinos, E., Esteve, I. y Guerrero, R. Comparison between direct methods for determination of microbial cell volumen electron microscopy and electronic particle sizing. *Applied of Environmental Microbiology*.1983;45:1651-1658.
- Morgan, D. R., Johnson, P. C., Du Pont, H. L, Satterwithe, T. K., Wood, L. V. Lack. Correlation between known virulence properties of *Aeromonas hydrophila* and enteropathogenicity for human. *Infectology and Immunology*.1985; 50: 62-67.
- Munro, A. L. S. The pathogenesis of bacterial disease of fishes. *Microbial biomases of fish*. Ed. by Robert. 1981:131-149.
- Munro, A. L. S. The pathogenesis of bacterial diseases of fish. En Roberts R-J. *Microbial diseases of fihshes*. Academic Press,London.1982;131-149.
- Negrete, R.P., Romero,J. J., Villegas, L. G., Vázquez, S. C. Presencia de plásmidos en *Pseudomonas* aisladas de peces de ornato. 2003;34(3)289-295.
- Negrete, R. P., Valencia, J. D., Villegas, L. G. y Romero, J. J. Bacteriosis por estrés ammbiental en granjas acuícolas rurales del Estado de México. *Soc. Rurales. Producción y Medio Ambiente* 2002;3(1):49-58.
- Negrete, R. P. y Romero, J. J. Presencia de bacterias patógenas en peces de ornato. *Rev. Hidrobiológica*. 1999; 9(b):85-94.
- Negrete, R. P. y Romero, J. J. Estudio cualitativo de las condiciones sanitarias de producción y manejo de granjas acuícolas en los estados de México y Morelos. *Rev. Hidrobiológica*.1998a;8(a):43-54.
- Negrete, R. P. y .Romero, J. J. Inducción de bacteriosis en *Cyprinus carpio* con bacterias aisladas de organismos enfermos cultivados en granjas piscícolas .*Rev. Hidrobiológica*. 1998b;8(2):1-10.
- Nieto,T. P., López, L. R., Santos, Y., Núñez, S. y Toranzo, A. E. Isolation of *Serratia plymuthica* as a an oportunistc pathoogen in rainbow trout *Salmo gairdneri* . *Richardson Journal of Fish Diseases*. 1990;13:175-177.
- NOM-010-PESC-1993. Diario oficila de la Nación 1994.
- NOM-011-PESC-1993. Diario Oficial de la Nación.1994.
- NOM-030.PESC-2000. Diario Oficial de la Nación 2000.

- PROY NOM-020- PESC-1993. Diario Oficial de la Nación 1996.
- PROY NOM-021-PESC-1994. Diario Oficial de la Nación 1996.
- PROY NOM-022-PESC-1994 Diariio Oficial de la Nación 1996.
- OIE. Diagnóstico manual for aquatic animal diseases. 3ª. Edición. OIE. Francia . 2000.
- Olsen, J. E.y Larsen, J. L. Restriction fragment length polymorphism of the *Vibrio anguillarum* serovar. 01 virulence plasmid. Applied of Environmental. Microbiology.1990;57:2750-2757.
- Omodei, A. Cognito agli storici e filosofi antichi Ann. Uni. Milano 1822; XXII:179-179.
- Pacha, R. E. y Ordal, E. J. *Myxobacterial* diseases of *Salmonids*, In. Snieszko. S.F. A symposium on diseases of fishes and shell-fishes. American Fish Society Special Publication. 1970;5:243-257.
- Phillips, M. J., Beveridge, M. C. M.y Ross, L. G. The environmental impact of salmonid cage culture in island fisheries . Present status and future trends. Journal of Fish Biology 1985;27:123-137.
- Pillay, T. V. R. Planning aquaculture. Development and introductory guide Fishing .News Book Oxford.1982;719-845.
- Piper, G. R. Fish hatchery managment department of interior. U.S Fish and Wildlife Service 1992;264-368.
- Popoff, M. y Veron, M. A taxonomic study of the *Aeromonas hydrophila* , *Aeromonas punctata*, group. Journal of General Microbiology.1976; 94: 11-22.
- Popoff, M. y Lallier, R. Biochemical and serological characteristics of *Aeromonas* . Methods in Microbiology.1984;16:127-145.
- Popoff, M. Genus III. *Aeromonas*. En: N.R. Krieg(Comp). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology,Vol.I. Williams and Wilkins, Baltimore.1981;l:345-348.
- Pouchet, T.Infusoires dans les dejectiions des cholérique . Comp. Rend. Academie des Sciences 1849; XXVIII: 555-556.

- Ranson, D. P., Lannan, C. N., Rohovec, J. S. y Fyer, J. L. Comparison of histopathology and caused by *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii* in three species of Pacific Salmon. *Journal of Fish Diseases*. 1984;7:107-115.
- Rodríguez, D. P. y Ribeiro, R.V. Fish management Department of Interior U.S.. Fish and Wildlife Service, Washington , D.C. 1995;264-369.
- Roberts, R. J. Introduction fish. En: Inglis. W. Roberts R.J. y Bromage R.N. Bacterial diseases of fish. Academic Press. London.1993:1-20.
- Rolleston, J. D. Bretonneau: his life and work. *Proceeding of Royal Society of Medical Section History of Med.*1924;18:1-12.
- Ross, A. J., Rucker, R. R. y Ewing, W. H. Description of a bacterium associated with redmouth diseases of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Canadian Journal of Microbiology*.1966;12:763- 770
- Saeed, M. D., Alamondi, M. M. M., y Al-Harbi, A. H. Histopathology of *Pseudomonas putrefaciens* associated with diseases in cultures rabbit fish *Sigmus rivulatus* (Forkai). *Journal of Fish Diseases*.1990;13:417-422
- Seidler, R. J., Allen, A., Lockman, H., Colwell, R. P., Joshep, S. W. y Daily, O. P. Isolation enumeration and characterization of *Aeromonas* from polluted waters encountered in diving operations. *Applied of Environmental Microbiology*. 1981;39:1010-1018.
- Shotts, E. B., Games, J. L., Martin, L. y Prestwood, A. K. *Aeromonas* induced death among fish in a eutrophic inland lake. *Journal of the American Medical Association*.1972;162:603-607.
- Singer, C. D. The scientific position of Girolamo Fracastoro with special reference to the source character and influence of his theory of infection *Annals of Medical History* 1792;1:1- 34.
- Singer, T.J., Choe, W., Schmidt, K. A. y Makula, R. 1992. Virulence plasmid pJM1 prevents the conjugal entry of plasmid DNA into the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. 1992.
- Snieszko, S. F. Recent advances in scientific knowledge and developments pertaining to diseases of fishes. *Advances in Veterinary Sciences and Comparative Medicine*.1973;17:291-314.
- Snow, J. On the mode of communication of cholera. London. 1849:31.

- Sokal, R.R. Statistical methods in systematics. *Biological Reviews*. 1965;40.
- Son, R., Rusul, G., Sahilah, A. M, Zainuri, A., Raha, R. y Salmah I. Antibiotic resistance and plasmid profile of *Aeromonas hydrophila* isolates from cultures fish, *Telapia (Telapia mossambica)*. *Letters in Applied Microbiology*. 1997;24:479-482.
- Stanley, R. S. *Lynch's Medical Laboratory Technology*. Ed. WB. Saunders. USA. 1986:434-440.
- Swayne, J. G. An account of certain organic cells peculiar of the evacuation of cholera *Lancet* 1849;II:398-410.
- Tolmasky, M. E., Salinas, P. C., Actis, L. A. y Crosa, H. J. Increased production of the siderophore angibactin mediated pJM1-like plasmid in *Vibrio anguillarum*. *Infection and Immunity*. 1988;25:1608-1614.
- Toranzo, A. E., Barja, J. L., Colwell, R. R. y Hetrick, F. L. Relationship between plasmid strain of *Vibrio anguillarum* isolated from different fish species. *Applied of Environmental Microbiology*. 1983;55:826-831.
- Toranzo, A. E. y Barja, L. Virulence factors of bacteria pathogenic for coldwater fish. *Annals Review of Fish Diseases*. 1993;3:5-36.
- Toranzo, A. E., Santos, Y., Lemos, M. L, Ledos, A., y Bolinches J. Homology of *Vibrio anguillarum* strain causing epizootics in turbot, salmon and trout reared on the Atlantic coast of Spain. *Aquaculture*. 1987;67:41-52.
- Tortora, G.J., Funke, B. R. y Case, Ch. *Microbiology an introduction*. 1977.
- Trier-Cuot, P., Carlier, C., Martin, P. y Courvalin, P. Plasmid transfer by conjugation from *Escherichia coli* to Gram-positive bacteria. *FEMS. Microbiol. Letts.*, 1978;48, 289-294.
- Turbull, P. C. B., Lee, J. V., Miliotis, M. D., Van de Walle, S., Koornhof, H. J., Jeffery, L, y Bryant, T. N. Enterotoxin production in relation to taxonomic grouping and source of isolation of *Aeromonas* species. *Journal of Clinical Microbiology*. 1984;19:175-180.
- Umbreit, W. W. *Marine Microbiology* (ed) W W Lirchfield. Dowdwn Hutchinsonand Ross. Inc. Benchmark papers in Microbiology. 1976;11:2-4.
- Valla, S., Frydenlund, K., Coucheron D.H., Haugan, K., johansen, B., Jorgensen T., Knudsen G y Strom, A. Development of a gene transfer system for

- curing of plasmids in the marine fish pathogen *Vibrio salmonicida* Aquaculture. 1992.
- Vittadini, C. Della natura del calcino o mal del segno. Istituto Lombardo 1852; III, 447-512.
- Wakabayashi, H. y Egusa, S. Characteristics of *Pseudomonas* sp. From a epizootic of pond cultured eels (*Anguilla japonica*). Bulletin of Japanese Society of Sciences and Fisheries. 1972;38:577-587.
- Wakayashi, H., Kanai, K., Hsu, T.C. y Egusa, S. Pathogenic activities. 1981.
- Wakabayasi, R. R., Joseph, S. W. *Aeromonas hydrophila*. Ecology and toxigenicity of isolates from a estuary. Journal Apply Bacteriology. 1981, 50:350-377. of *Aeromonas hydrophila biovar hydrophila* (Chester) Popoff and Veron. 1976 to fishes. Fish Pathology.
- Waluga, D. Enzootion of focal colliacquative necrosis in *Abramis brama* (L.). Acta Hydrobiological. 1962;4:29-38.
- Watanave, T. A., Ogata, Y., y Egusa, S. R. Factors related to fish culturing. Ann. New York. Academy of Sciences. 1971;182:383-410.
- Wiik, R. O., Andresen, A. y Daae, F. L. Relationship between plasmid and phenotype of presuntive strains of *Vibrio anguillarum* isolation from differents fish .Applied of Environmental Microbiology 1989;55:826-831.
- Yeast, G. D. Some observations on the opinions of the ancients respecting Contagio. Quart. Filosphi Literature Sciences and Arts, London., 1819;VI:124-134.
- Zanetti, S., Deriu, A., Dupre, I., Snaguinetti, M., Tadda, G. y Sechi, L.A. Differentiation of *Vibrio alginolyticus*. Strain isolated from sardina aters by ribotyping and new rapid PCR Fingerptinting method. Applied and Environmental Microbiology .1999;5(5):1871-1875.
- Zimmermann, R. y Meyer-Reil, L. A. A new method for fluorescence staining of bacterial populations on membrane filters. Kieler Meeresforsch. 1974;30:1, 24-27.
- Zimmermann, R. Estimation of bacterial number and biomass by epifluorescence microscopy and scanning electron microscopy. Reinheimer, G. (ed). Microbial ecology of a brackish water environmental. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Alemania. 1977;103-120.

Zobell, C. E. y Well, N. A. An infectious dermatitis of certain marine fishes. *Journal of Infection Diseases*. 1934;55:139-141.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

Presencia de plásmidos en pseudomonas aisladas de peces de ornato

Presence of plasmids in pseudomonas isolated from ornamental fish

Pilar Negrete Redondo*
Jorge Romero Jarero**
Gabriela Villegas López***
Verónica del Carmen Vázquez Sánchez†

Abstract

Following the analysis of the sanitary condition of production in fish farms from the state of Morelos in Mexico, which have used antibiotics continuously in order to prevent bacterial infection since all the fish farms have presented outbreaks, six different species of the Pseudomonadaceae family: *Pseudomonas cepaciae*, *Pseudomonas diminuta*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas sutzerii* and *Pseudomonas vesicularis* were isolated, purified and identified. These bacteria are pathogenic to both humans and fish. The alkaline lysis technique was used to obtain DNA from these bacteria. Antibiotic resistant plasmids of very high molecular weight were obtained from all of them. Base pair number was determined for all plasmids. We demonstrated the use of antibiotics as preventative medicine against bacterial infections in all of the farms sampled. The objective of this study was to identify the presence of plasmids that are resistant to antibiotics in bacteria from the Pseudomonadaceae family from ornamental fish from the Cichlidae, Poeciliae and Cyprinidae families, cultivated in fish farm from the state of Morelos, Mexico.

Key words: ORNAMENTAL FISH, AQUACULTURE, PSEUDOMONAS, PLASMIDS, ANTIBIOTICS.

Resumen

Después de haber efectuado el análisis de las condiciones sanitarias de producción de granjas piscícolas del estado de Morelos, México, que han usado sistemáticamente antibióticos para prevenir y controlar las infecciones de origen bacteriano sobre los cultivos, todas las granjas han presentado epizootias, se aislaron, purificaron e identificaron seis especies de bacterias pertenecientes a la familia pseudomonadaceae: *Pseudomonas cepaciae*, *Pseudomonas diminuta*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas sutzerii* y *Pseudomonas vesicularis*, son patógenas del ser humano y de peces. Mediante la técnica de extracción alcalina, se determinó la presencia de plásmidos resistentes a antibióticos, de alto peso molecular, en todas las cepas. Se determinó el número de bases para cada plásmido. Se comprobó el uso de antibióticos como medida preventiva de infecciones bacterianas en las granjas en donde se efectuaron los muestreos. El objetivo del presente estudio fue comprobar la presencia de plásmidos resistentes a antibióticos en bacterias de la familia pseudomonadaceae de peces de ornato pertenecientes a las familias de los cíclidos, poecilidos y cyprinidos, cultivados en granjas piscícolas de Morelos, México.

Palabras clave: PECES ORNAMENTALES, ACUICULTURA, PSEUDOMONAS, PLÁSMIDOS, ANTIBIÓTICOS.

Recibido el 14 de octubre de 2002 y aceptado el 12 de marzo de 2003.

- * Departamento El Hombre y su Ambiente, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calz. del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, México, D. F.
- ** Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.
- *** Departamento El Hombre y su Ambiente, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calz. del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, México, D. F.
- † Departamento El Hombre y su Ambiente, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calz. del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, México, D. F.

each of the ciclididae, poecilidae and cyprinidae families. Fish were extracted from the cultivation ponds using a fish net, and were immediately euthanized by placing them in a 1% xylazine bath and then proceeding to the dissection. Prior to the first incision, disinfection of the dissection area was carried out using a swab dipped in ethyl alcohol. Dissection was carried out by cutting along the lateral line, from the operculum to the anus, so as to expose the viscera. A sterile bacteriological loop was used to collect a kidney sample from each fish,^{7,8} which was then inoculated onto a brain-heart infusion agar (BHIA).

Samples were transported to the laboratory where they were incubated for 24 h at room temperature. They were then purified through successive re-inoculations onto the same type of agar. Once the purity of the samples had been proved via microscopic observation, they were Gram-stained. Gram negative strains were identified using API-20E and API-20NE^{9,10} and complementary identification tests.¹¹

The susceptibility of the strains identified to the following antibiotics: bacitracin, ampicillin, streptomycin, trimethoprim, kanamycin and chloramphenicol, was determined using the standard single disk method.¹² Strains were inoculated onto Lurian and Bertani (LB) agar plates, incubated at 30°C for 24 h, and then colonies were transferred to 5 ml tubes containing LB broth until a McFarland turbidity of 0.5 was obtained. Strains were then inoculated onto Huller-Milton agar plates using a sterile swab and, after 15 min, were placed on sterile filter disks impregnated with the previously described antibiotics, each at a 30 µg concentration, and incubated at 30°C for 24 h. Strains were classified as resistant (R), intermediate (I) or susceptible (S), depending on the diameter of the inhibition halo produced, as measured by Vernier calipers and including the diameter of the filter disk (6 mm).^{14,15}

Following inoculation on LB agar plates and incubation at 30°C for 24 h, the colonies were transferred to 5 ml tubes containing LB broth, and incubated in a constant agitation water bath at 30°C for 24 h. A pipette was used to transfer 2 ml of the culture to a sterile Eppendorff tube for centrifugation at 4666 g for 30 s and subsequent removal of the supernatant. The pellet that remained at the bottom of the Eppendorff tube was resuspended in 100 µl of lysozyme solution and agitated with a Vortex for 1 min, then incubated on ice for 30 min. Following this, 200 µl of sodium dodecyl sulfate was added and mixed gently by inversion, then incubated on ice for 5 min, after which 150 µl of 3M sodium acetate were added and mixed by inversion, for incubation during 60 min and further centrifugation at 4666 g for 5

lia). Los peces se extrajeron de los estanques de cultivo con una red de cuchara, inmediatamente después se sacrificaron adormeciéndolos en baño de xilocaína al 1%. Posteriormente se efectuó la disección por arriba y a lo largo de la línea lateral, desde el opérculo y hasta el ano, de tal manera que fueran expuestas las vísceras; los cuerpos de los individuos fueron previamente desinfectados, pasando sobre el campo de disección un hisopo impregnado con alcohol etílico. Con un asa bacteriológica previamente esterilizada, se tomó una muestra del riñón de cada uno de los peces,^{7,8} y se sembró en placas de agar de infusión de cerebro corazón (BHIA, por sus siglas en inglés).

Las muestras fueron trasladadas al laboratorio, en donde se incubaron por 24 h a temperatura ambiente, posteriormente se procedió a purificar por resiembra sucesivas en placas del mismo agar. Una vez comprobada la pureza de las cepas mediante observación de microscopio óptico, se efectuó la tinción de gram, las cepas que tiñeron gram negativo fueron identificadas por medio del API-20E y API-20NE^{9,10} y pruebas de identificación complementarias.¹¹

La susceptibilidad a los antibióticos bacitracina, ampicilina, estreptomycin, trimetoprim, kanamicina y cloranfenicol, de las cepas identificadas, se determinó por el uso del método en placa.¹² Las cepas se sembraron en placas de agar de Lurian y Bertani (LB), se incubaron a 30°C durante 24 h, las colonias que crecieron se trasladaron a tubos con 5 ml de caldo de LB hasta obtener turbidez de 0.5 de Mc Farland,¹³ enseguida con un hisopo estéril se sembraron las cepas en placas de agar de Huller-Milton, después de 15 min se colocaron los discos de papel filtro estéril, impregnados de los antibióticos anteriormente mencionados a concentración de 30 µg cada uno, se incubaron a 30°C durante 24 h. Las cepas se clasificaron en resistentes (R), intermedio (I) o susceptibles (S), dependiendo del diámetro de los halos medidos con un vernier, incluyendo el diámetro del papel filtro (6 mm).^{14,15}

Después de haber sembrado las cepas en placas de agar de LB, y de incubarse a 30°C durante 24 h; las colonias crecidas se trasladaron a un tubo con 5 ml de caldo de LB, se incubaron a baño María con agitación a 30°C durante 24 h; con una pipeta se transfirieron 2 ml del cultivo a otro tubo estéril Eppendorff, se centrifugó a 4666 g durante 30 seg y se removió el sobrenadante. La pastilla que permaneció en el fondo del tubo Eppendorff se resuspendió con 100 µL de solución de lisosima; esto último se logró agitando con un vortex durante 1 min, posteriormente se incubó en hielo durante 30 min, se agregaron 200 µL de duodecil sulfato de sodio, se mezcló suavemente por inversión y se incubó durante 5 min en hielo, después de lo cual se añadieron 150 µL de acetato de sodio 3 M, se mezcló suavemente por inversión del tubo y se incubó por 60 min, nuevamente se centrifugó durante 5 min a 4666 g, el sobrenadante se transfirió a otro tubo Eppendorff estéril y se añadieron 1 000 µl de etanol frío, se incubó 30

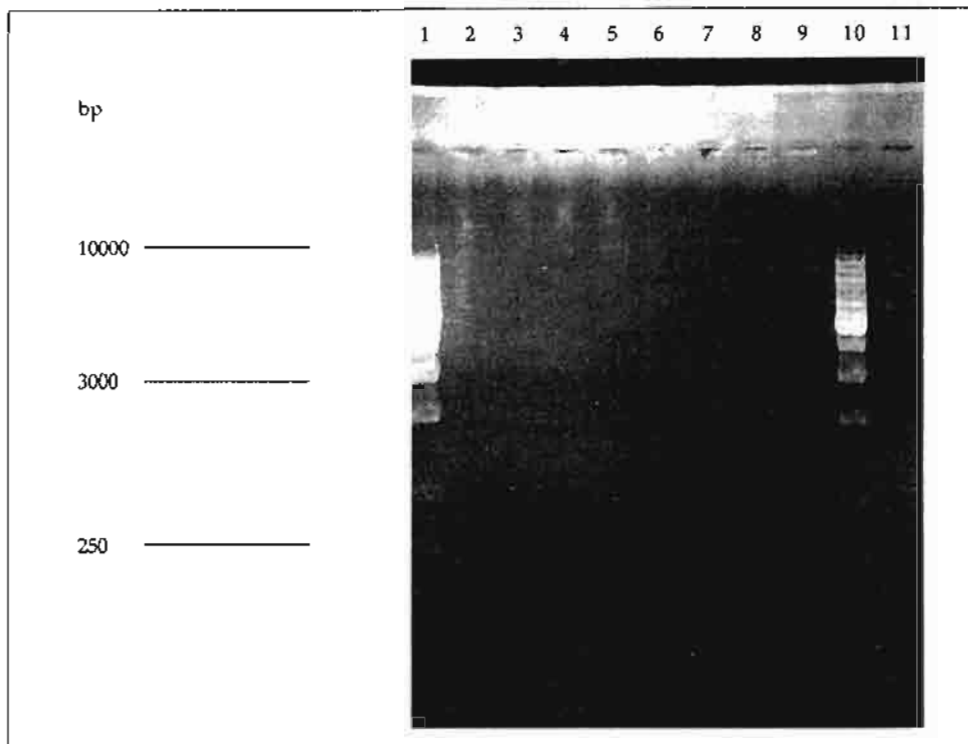


Figura 1. Gel de agarosa (1) Marcador de peso molecular Fermentas 1 kb; (2) *Pseudomonas vesicularis*; (3) *Pseudomonas fluorescens*; (4) *Pseudomonas diminuta*; (5) *Pseudomonas fluorescens*; (6) *Pseudomonas fluorescens*; (7) *Pseudomonas diminuta*; (8) *Pseudomonas cepaciae*; (9) *Pseudomonas putida*; (10) Marcador de peso molecular Fermentas 1 kb y (11) *Pseudomonas sutzerii*. (GeneRulerTM MB FERMENTAS. 1kb. DNA Ladder.)

Agarose gel (1) Molecular weight marker Fermentas 1 kb; (2) *Pseudomonas vesicularis*; (3) *Pseudomonas fluorescens*; (4) *Pseudomonas diminuta*; (5) *Pseudomonas fluorescens*; (6) *Pseudomonas fluorescens*; (7) *Pseudomonas diminuta*; (8) *Pseudomonas cepaciae*; (9) *Pseudomonas putida*; (10) Molecular weight marker Fermentas 1 kb; and (11) *Pseudomonas sutzerii*. (GeneRulerTM MB FERMENTAS. 1kb. DNA Ladder.)

mobility of the DNA for each of the extractions on the calculated curve. Molecular weights and the corresponding base pairs for each of the plasmids extracted from the *Pseudomonas* were obtained (Table 1).

The molecular weights resulted to be too high, falling beyond the regression curve. Therefore, we opted to use markers of known molecular weights;¹⁷ the ranges of the molecular weights registered ran from 3,157 bp up to 30 000 bp. In the agarose gel, wells 2, 3, 4, 5 and 11 had more than one band (Figure 1). When calculating the MDa corresponding to each range of base pairs, the ranges obtained were from 286 MDa to 343 MDa.

All the plasmids extracted from the *Pseudomonas* strains presented ranges in common, between 3 000 bp, 18 000 bp and 16 363 bp, thus confirming that the bacteria received an antibiotic in common.

The *E. coli* markers, HB 101, R 27 and RP 24, had molecular weights of 143 MDa, 112 MDa and 136 MDa, respectively, corresponding to $92\,500 \times 10^6$, $22\,800 \times 10^6$ and $88\,400 \times 10^6$. When plotting a curve with these, the molecular weights and the logarithm of the relative mobility of the plasmids under investigation would not fit, since their weights were too heavy, ranging from 3 157 bp to 30 000 bp (Table 1).

The fact that plasmids with high molecular weights (3 157 to 16 363 bp) were located, indicates exposure of cultivated organisms, from which bacterial strains were isolated, to indiscriminate antibiotic dosing and use,

Los pesos moleculares fueron demasiado elevados, saliendo fuera de la curva de regresión, por lo que se optó por usar marcadores de peso molecular conocidos;¹⁷ los rangos de los tamaños moleculares registrados fueron desde 3 157 pb hasta 30 000 pb. En los pozos del gel de agarosa: 2, 3, 4, 5 y 11 se obtuvo más de una banda (Figura 1). Al calcular los MDa correspondientes a cada rango de pares de bases se obtuvieron rangos desde 286 MDa hasta 343 MDa.

Todos los plásmidos extraídos de las cepas de *pseudomonas* presentaron en común de rangos entre 3 000 pb, 18 000 pb y 16 363 pb, lo que comprueba que las bacterias recibieron un antibiótico en común.

Los marcadores de las cepas *E. coli*, HB 101, R 27 y RP 24, registraron los pesos moleculares de 143 MDa, 112 MDa y 136 MDa, respectivamente, que corresponde a $92\,500 \times 10^6$, $22\,800 \times 10^6$ y $88\,400 \times 10^6$; trazaron una curva dentro de la cual los pesos moleculares y el logaritmo de la movilidad relativa de los plásmidos problema no fue posible interpolar, debido a que sus pesos moleculares son demasiado pesados, con rangos desde 3 157 pb hasta 30 000 pb (Cuadro 1).

El hecho de haber encontrado plásmidos de pesos moleculares altos: 3 157 pb a 16 363 pb, indica la exposición de los organismos cultivados de donde se aislaron las cepas bacterianas a dosis y tipo de antibióticos de una forma indiscriminada, en comparación con el plásmido RP 24m, que fue resistente a la kanamicina, estreptomycin y la ampicilina.

from the producers and from the results obtained during the antibiotic resistance analysis on each isolated strain. The routine administration of antibiotics in the feed is considered both a growth and fattening strategy in the cultivated organisms, and is employed without prior knowledge and understanding of the antibiotics being used.

Referencias

1. Romero JJ, Salas TA. Estudio de frecuencias de enterobacterias resistentes a antibióticos y metales pesados aisladas en ambientes marinos. *Biotechnol Bioeng* 1993;AM54-57.
2. Amabilé C F. La resistencia bacteriana a los antibióticos. *Cienc Des* 1988;80:57-68.
3. Schutt C. Plasmid in the bacteria assemblage of a dystrophic lake, evidence for plasmid encode. *Microbiol Ecol* 1989;17:49-56.
4. Kobari H, Sullivan C W, Shizuya H. Bacterial plasmid in antarctic natural microbial assemblages. *Appl Environ Microbiol* 1984;48:246-262.
5. Tórtora G J, Funke B R, Case Ch L. Introducción a la microbiología. 3ª ed. España: Acribia 1995.
6. Aoki T. Technology of antibiotics resistant determinants of R-plasmid from fish pathogenic bacteria. V International Symposium of Microbiology and Ecology. 1989 august 27-september 1; Kyoto, Japan. Japan. Japanese Microbiology Society 1989:571-576.
7. Austin B, Austin, D A. Bacterial fish pathogen diseases in farmed and wild fish. London: England Ellis Horwood Ltd 1987.
8. Munro A L S. The pathogenesis of bacterial diseases of fish. En Robles RJ editor *Microbial diseases of fishes*. London.: Academic Press 1982;131-149.
9. Analytical Profile Index. Enterobacteriaceae and other Gram negative bacteria, 4ª ed. Francia: BioMerioux 1977.
10. Analytical Profile Index. Enterobacteriaceae and other Gram negative bacteria, 4ª ed. Francia: BioMerioux 1989.
11. Bradshaw L J. *Laboratory microbiology*. 2ª ed. Philadelphia: WB Saunders, 1973.
12. Bauer A, Kirby W M, Sherris J C, Tueck, M. Antibiotic susceptibility by a standard single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966;36:493-496.
13. Hindler, J. Antimicrobial susceptibility testing. In: Isenberg H.D editor. *Clinical Microbiology Procedures*. Handbook. Washington: Ame Soc Microbiol, 1992.
14. Giono C S. Prueba de Baues-Kirby para sensibilidad a los antimicrobianos. *Infectol. III*. 1983;7:325.
15. Stanley R S. *Lynch's Medical Laboratory Technology*. Philadelphia: WB Saunders, 1983.
16. Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. *Molecular cloning (Laboratory Manual)*, 11a ed. New York: Cold Harbor Laboratory, 1995.
17. Ausubel M F, Brent R, Kingston E R. *Short protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley & Sons, Inc 1999.

Resistencia a antibióticos y presencia de plásmidos en *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis* y *Vibrio furnissii*, aislados de *Carassius auratus auratus*

Antibiotic resistance and presence of plasmids in *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis*, and *Vibrio furnissii* isolated from *Carassius auratus auratus*

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

Abstract

We isolated and identified 70 bacterial strains from the ornate fish species *Carassius auratus*, in specimens with signs of infection. The isolated and identified bacterial species, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis*, and *Vibrio furnissii*, have been reported to cause diarrhea in humans, and the first two are considered very aggressive pathogens in *Cyprinus carpio* cultures. For this reason, antibiotics to avoid and control the presence of these bacteria have been inadequately used and abused. The uncontrolled use of antibiotics has given rise to the presence of an R-plasmid in bacteria, as a response to the environmental stress represented by these chemical compounds. When R-plasmid carrying bacteria are transmitted directly to humans, be it by direct contact with the host during handling in culture, as a pet, in consumption, or by a conjunction of all these factors, the problem exceeds aquaculture and becomes a public health issue. All the studied strains presented antibiotic resistance. We recorded resistance to more than one antibiotic, and up to seven in some cases. Furthermore, 100% of the strains carried plasmids resistant to antibiotics with molecular weights ranging from 25.7 kb to 6.6 kb. The *Aeromonas hydrophila* strains presented resistance to the following antibiotics: cephalothin (CF), tetracycline (T), nitrofurantoin (NF), ampicillin (AMP), carbenicillin (CB), and kanamycin (K). The molecular weights of the plasmids found ranged from 25.7 to 6.6 kb, 24% of *Aeromonas hydrophila* carried plasmids of 14.2 kb and 21% of 22.5 kb. Plasmids of 15 to 6.9 kb were extracted from *Vibrio fluvialis* strains, 58% were of 15 kb and were resistant to CF, AMP, T, NF, CB. *Vibrio furnissii* carried plasmids ranging from 15 to 6.6 kb, 46% these strains were of 14.2 kb and presented resistance to CF, AMP, T, NF, CB, and K. The results were the same independent of the origin of the samples, be it water, food or an organism. None of the plasmids were able to transfer to *Escherichia coli* and no incompatibility group could be determined.

Key words: AQUACULTURE, RESISTANCE, ANTIBIOTICS, R-PLASMIDS, CONJUGATION, *VIBRIO FLUVIALIS*, *VIBRIO FURNISSII*, *AEROMONAS HYDROPHILA*, *CARASSIUS AURATUS*, CHEMICAL CONTROL.

Resumen

Se aislaron e identificaron 70 cepas bacterianas del riñón de peces de ornato *Carassius auratus* con signos y lesiones de infección. Las especies bacterianas aisladas e identificadas, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis* y *Vibrio furnissii*, han sido descritas como causantes de diarrea en humanos y como patógeno muy agresivo en cultivos de *Cyprinus carpio*. Por esta razón se ha hecho mal uso y abuso de antibióticos para evitar y controlar la presencia de esta bacteria en los cultivos. El uso fuera de control de los anti-

Recibido el 26 de marzo de 2003 y aceptado el 24 septiembre de 2003.

* El Hombre y su Ambiente, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calz. del Hueso 1 100, Col. Villa Quietud, México, D. F.

**Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

*** Hidrobiología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, 09340, México, D. F.

The Cyprinidae family includes species such as *Carassius auratus*, popularly known as the goldfish, which, for its beauty, has a high commercial demand in Mexico.

An aquaculture farm is an open system with three important inputs: water, feed for the cultivated organisms, and the organisms themselves. From a sanitary point of view these three elements are very relevant, since it is with them that diverse contaminating and bio-aggressor elements are introduced into the system. Any of these can distort the sanitary handling conditions and alter the health-disease balance of the system, allowing for the arrival and dissemination of infectious diseases.

An aquaculture farm is an enterprise aimed at cultivating certain species with the least economical loss; hence, input, dispersion, and permanence of bacteria in the facilities must be avoided. To accomplish this, and believing that the best strategy is prevention, chemical compounds and antibiotics have been used and abused to control infections. These chemical compounds and/or antibiotics are routinely administered incorporated into the balanced feed provided to the fish,⁴⁻⁶ or are applied directly to the ponds. This is done without knowledge of whether and infectious disease is actually present, or which is the bacterial species that is infecting the production at that moment, and, should this be the case, which antibiotic and at what dosage, is required to destroy the specific bacterium.

The routine use of these practices by fish cultivators, to avoid infectious diseases in farms, has resulted in an increase of resistant plasmids in diverse bacterial species which are pathogenic to fish⁷⁻¹⁴ as well as some that are pathogenic to humans. The latter, when in contact with humans, either through food or in ornamental fish, can transmit the plasmid and consequently, antibiotic resistance. This could be a public health problem, such as might arise from the conjugation of the plasmid from carrying bacteria to receptor bacteria that are pathogenic for humans, such as *Escherichia coli*.^{7,15} In some countries, such as the USA and some in Europe, this problem has already been reported.¹⁶ However, in Mexico, various fish farmers that have been studied,¹⁷ whose primary and most important economic income comes from these small artisan farms have overused and misused antibiotics incorporated in the balanced feed routinely administered to the fish while attempting to prevent and control infectious diseases in their farms. Therefore, it is important to establish the sensitivity or resistance to antibiotics that might have been acquired by the pathogenic bacteria present in *Carassius auratus auratus*, to determine whether this farming practice has generated plasmids resistant to the antibiotics used in aquaculture, and finally to establish the capacity of R-plasmid carrying bacteria of transmitting said plasmid, by conjugation, to *E. coli* receptor strains.

crada en la larga cadena de comercialización, sobre todo al ser manejada como animal de compañía.

La familia Cyprinidae incluye especies como *Carassius auratus*, popularmente conocidos como pez dorado, que por su belleza son de gran demanda comercial en México.

Una granja acuícola es un sistema abierto con tres importantes tipos de ingresos: El agua, el alimento para los organismos cultivados y los mismos organismos para cultivar. Desde un enfoque sanitario, estos elementos son de importancia, ya que con ellos ingresan al sistema diferentes elementos, como contaminantes y bioagresores que perturban las condiciones sanitarias de manejo y alteran el equilibrio salud-enfermedad en el sistema y como consecuencia la enfermedad infecciosa puede instalarse.

Una granja acuícola es una empresa cuyo propósito, además de cultivar determinadas especies, es evitar las pérdidas económicas, por lo que los acuicultores deben prevenir los ingresos, la dispersión y permanencia de bacterias dentro de sus instalaciones. Para evitarlo, y creyendo que la mejor estrategia es la prevención, se ha usado y abusado de la aplicación de químicos y antibióticos para el control de las infecciones, los cuales son administrados rutinariamente e incorporados en el alimento balanceado para peces,⁴⁻⁶ o son administrados directamente dentro de los estanques de cultivo, desconociendo si existe el estado de enfermedad infecciosa, la especie de bacteria que ha infectado la producción, para el caso de que así sea, el tipo de antibiótico adecuado para destruir la bacteria específica y la dosificación necesaria.

El uso rutinario de esta práctica por parte de los acuicultores, con el objetivo de resolver el problema de enfermedades infecciosas en sus granjas acuícolas, ha resultado en un incremento de la presencia de plásmidos resistentes en diferentes especies de bacterias patógenas de peces,⁷⁻¹⁴ algunas patógenas para el humano también, y que al entrar en contacto con éste, como fuente de alimento o como animal de compañía, puede transmitirle plásmidos y como consecuencia la resistencia a antibióticos, implicando un problema de salud pública, que puede ser llevado a cabo por conjugación del plásmido de las bacterias portadoras a las bacterias receptoras, patógenas para el humano, como *Escherichia coli*.^{7,15} En algunos países, como Estados Unidos de América y algunos europeos, este problema se ha notificado.¹⁶ Sin embargo, en México varios piscicultores estudiados,¹⁷ cuyo primer y más importante ingreso económico proviene de estas pequeñas granjas rústicas, al tratar de prevenir y controlar las enfermedades infecciosas dentro de sus instalaciones, han iniciado el uso desmedido de antibióticos incorporados a alimento balanceado suministrado rutinariamente a los peces. Por tal motivo es importante establecer la sensibilidad o resistencia a los antibióticos, que como resultado de este manejo inadecuado pudieron haber adquirido las bacterias patógenas presentes en *Caras-*

and then incubated in ice for 30 min, adding 200 μ l sodium dodecyl sulphate, mixed softly by inverting the tube and incubated for 5 min in ice. Then, 150 μ l of 3M sodium acetate were added, mixed softly by inverting the tube and incubated for 60 min, to then be centrifuged again at 14,000 rpm for 5 min. The supernatant was transferred to another sterile Eppendorff tube, adding 1,000 μ l of cold ethanol, incubated for 30 min and then centrifuged at 14,000 rpm for 30 min. The supernatant was removed, the pellet was dissolved in 100 μ l of 0.01M sodium acetate and 0.05M Tris with a pH of 8, and precipitated again in 300 μ l of cold ethanol.³¹

The supernatant was eliminated and 10 μ l of 5X sample buffer solution was added (25% saccharose, 5 mM sodium acetate, 0.05% bromophenol blue, and 0.1% SDS).

Extracts were treated with bovine pancreatic RNAase I-AS type, at a concentration of 0.01 μ g/ml, and then incubated in a double water bath at 60°C for 10 min. For electrophoresis, 10 μ l of the samples obtained were placed in the agarose gel wells at 0.6% were applied. Gels were prepared with borate TB buffer run at 0.5 X and 0.6 X of agarose. Electrophoresis was performed at 70 V and 250 W. Gels were stained for 45 min and revealed with ethidium bromide dissolved in distilled water at a concentration of 0.5 μ g/ml. Once revealed, gels were washed to eliminate excess ethidium bromide and then placed in a short-wave UV transilluminator. Gels were photographed with an instant Polaroid camera using Polaroid 667 films.

Extracts from the isolated strains were simultaneously run on gel with the known molecular weight marker: GENE RULER TM Ikb DNA LADDER.³² Finally, the relative mobility of the plasmid and the reference marker were measured by applying an inverse three rule to obtain the molecular weights of the plasmid in numbers of bases pairs in relation to the number of base pairs of the marker (10 000 bp).

To know whether the isolated strains were able to transmit the R-plasmid by conjugation to a receptor bacterium, a collection strain of *E. coli* (ATCC25922) was inoculated in lactose broth and incubated in a double water bath, with movement, at 37°C for 24 h. At the same time, all the isolated strains were inoculated in tubes containing LB broth incubated in the same way as *E. coli*, but at 22°C. On the following day, 1 mL from the *E. coli* cultivating tubes was transferred to the tubes with the isolated strains and incubated again as previously described. Afterwards three loop-full samples from each tube were inoculated in eosin methylene blue (EMB) agar plates prepared with 2.5 mg/L. Plates were finally incubated at 30°C for 24 h and observed for one week, recording growth or lack of growth of the receptor bacterium.

The whole procedure was performed with collection strains of *Aeromonas hydrophila* (ATCC35654), *Aeromonas caviae* (ATCC15468), *Vibrio alginolyticus* (ATCC177), and *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC7802).

dependiendo del diámetro de los halos, incluyendo el diámetro de los discos (6 mm).²⁸⁻³⁰

La extracción de plásmidos se efectuó utilizando la técnica de lisis alcalina.³¹ De nuevo las cepas se sembraron en placas de agar de Luria Bertani (LB) y se incubaron a 30°C durante 24 h, posteriormente las colonias que crecieron se transfirieron a tubos con 5 mL de caldo de LB, se incubaron en baño María con agitación a 30°C durante 24 h, 2 mL del cultivo fueron transferidos a otro tubo estéril Eppendorff, se centrifugó a 25 000 g durante 30 seg, el sobrenadante se removió. La pastilla que permanece en el fondo del tubo Eppendorff se resuspendió con 100 μ l de solución de lisosima, esto se resuspendió agitándose con un vortex durante 1 min, posteriormente se incubó en hielo durante 30 min, se agregó 200 μ l de duodecil sulfato de sodio, se mezcló suavemente por inversión y se incubó durante 5 min en hielo, después se añadieron 150 μ l de acetato de sodio 3 M, de nuevo se mezcló suavemente por inversión del tubo y se incubó por 60 min, nuevamente se centrifugó durante 5 min a 25 000 g, el sobrenadante se transfirió a otro tubo Eppendorff estéril, añadiendo 1 000 μ l de etanol frío, se incubó 30 min y se centrifugó 30 min a 25 000 g, el sobrenadante se removió, la pastilla se disolvió con 100 μ l de acetato de sodio 0.1 M y tris 0.05 M pH 8, reprecipitando en 300 μ l de etanol frío.³¹

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

Las extracciones se trataron con RNAsa pancreática de bovino tipo I-AS, a concentración de 0.01 μ g/mL, se incubaron en baño María a 60°C durante 10 min. Se aplicaron 10 μ l de las muestras obtenidas en los pozos de los geles de agarosa al 0.6% para el análisis de electroforesis. Los geles se prepararon con amortiguador borato TB de corrida al 0.5 X y 0.6 X de agarosa. La electroforesis se llevó a cabo a 70 v de voltaje, 250 w de poder. Los geles fueron teñidos durante 45 min y revelados con una solución de bomuro de etidio disuelto en agua destilada a concentración de 0.5 μ g/mL. Una vez revelados los geles, se lavaron con agua durante 30 seg con el fin de eliminar excesos de bromuro de etidio, fueron colocados en un transiluminador de rayos UV de longitud de onda corta. Las fotografías de los geles fueron tomadas con transiluminador con cámara fotográfica Polaroid instantánea con cartuchos de película polaroid 667.

Las extracciones procedentes de las cepas aisladas se corrieron en gel simultáneamente con el marcador de peso molecular conocido: GENE RULER TM Ikb DNA LADDER.³² Finalmente se midió la movilidad relativa de los plásmidos y del marcador de referencia, aplicando una regla de tres inversa para obtener los pesos moleculares en número de bases de pares, en función del número de pares de bases conocido del marcador (10 000 pb).

Para saber si las cepas aisladas de los peces tenían

feed,^{4,5} were obtained, and no special association was found among them.

Among the scope of antibiotics used in the present study, those most widely accepted by aquaculture farms, and those to which most resistant strains are found are: cephalothin, ampicillin, nitrofurantoin, tetracyclin, chloramphenicol, kanamycin, and carbenicillin. However, the sensitivity of the same bacteria to a greater variety of antibiotics could not be established.

In this study, we obtained plasmids of 6.6 to 25.7 kb for *A. hydrophila*, coinciding with Son *et al.*;¹⁶ however, Chang and Bolton³³ and Chaudhury *et al.*³⁴ report plasmids ranging from 85.6 to 159 kb for strains of the same species. The plasmids obtained from strains of *Vibrio fluvialis* and *Vibrio furnissii* revealed larger molecular weights, ranging between 15 and 6.6 kb, than those reported by Giles *et al.*³⁵ for *V. anguillarum*. This indicates that R factor mediating resistance in *A. hydrophila*, 16 as well as in *V. fluvialis* and *V. furnissii* is of variable size (Table 2).

A larger variety of molecular weights can be asso-

CF, AMP, NF, K y T; *V. parahaemolyticus*, *A. hydrophila* y *A. caviae* resistieron además para CRO y NF; *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* presentaron resistencia para CTX y NET, todas portaron un plásmido de 25.7 kb. La cepa de colección *E. coli* no registró resistencia a ningún antibiótico, pero sí sensibilidad a todos, además de no portar ningún plásmido.

No se estableció ninguna asociación especial de los datos obtenidos con el tipo de procedencia de las muestras: Agua, alimento u organismo. No se obtuvo crecimiento en las cajas sembradas con *E. coli*, como receptoras de plásmidos.

Discusión

Los patrones de resistencia de *A. hydrophila*, *V. fluvialis* y *V. furnissii* a antibióticos de uso comercial, a través de 70 cepas, se muestran en el Cuadro 1.

En este estudio se obtuvieron los perfiles de resistencia y plásmidos-R, tanto de las cepas que procedían de agua y del riñón de los peces,^{10,11} como también del alimento balanceado,^{4,5} sin establecerse ninguna

Cuadro 1

RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE CEPAS BACTERIANAS AISLADAS DE PECES DE ORNATO

Carassius auratus

ANTIBIOTIC RESISTANCE OF BACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM ORNAMENTAL FISH

Carassius auratus.

Antibiotics	Resistant	Susceptible	Intermediate
Cephalothin	75	0	0
Chloramphenicol	26	23	23
Ceftriaxone	24	37	14
Ampicillin	71	3	1
Amikacin	12	60	3
Trimethopim	11	62	3
Ceftaxine	22	38	15
Nephilmecin	18	57	0
Pefloxacin	7	41	27
Carbecillin	46	19	9
Gentamycin	64	7	4
Kanamycin	15	58	3
Nitrofurantoin	49	15	11
Tetracycline	66	4	5

The presence of more than 1 plasmid indicates the use of more than 1 antibiotic in an attempt to control the infection detected in the fish hatcheries used in this study. On the other hand, the difference in extracted plasmids indicates that different hatches of fish were introduced to the sampled farm, suggesting that the fish introduced were already carrying resistant bacteria that, under different environmental conditions, manifested themselves as pathogenic and again received doses of different antibiotics.

The plasmids obtained in the present study were unable to be transferred to *E. coli*, hence, they do not belong to any incompatibility C or U groups.¹⁵

However, legal restrictions are needed to regulate the use of antibiotics to prevent and control infections in aquaculture, since they will help to reduce the formation and dispersion of R-plasmids in other species that might present such a capacity.

Referencias

1. Pillay T V R. Planning aquaculture. Development and introductory guide Fishing. Oxford: News Book, 1977.
2. Bernabe G. Acuaculture. Barcelona: Omega, 1989
3. Negrete R P, Romero J J. Presencia de bacterias patógenas en peces de ornato. Hidrobiológica 1999;9:85-94.
4. Davis J F, Hayasaka S S. Pathogenesis bacteria associated with cultured American eels. J Fish Biol 1983;23:557-564.
5. Hasting T, McKay A. Resistance of *Aeromonas salmonicida* to ocolinic acid. Aquaculture 1987;61:165-171.
6. Mandigan T M, Martinko M J, Parker J. Biología de los microorganismos. Madrid: Prentice-Hall 2000.
7. Aoki T, Egusa S, Kimura T, Watanabe K. Detection of R factors in naturally occurring *Aeromonas salmonicida* strains. Appl Microbiol 1971;22:716-717.
8. Aoki T, Kitao T, Kawano K. Changes in drugs resistance of *Vibrio anguillarum* in cultures ayu, *Plecoglossus altivelis*. Temminck and Schlegel, in Japan. J Fish Dis 1981;4:223.
9. Aoki T, Kitao T, Iemura Y, Mitoma Y, Nomura T. The susceptibility of *Aeromonas salmonicida* strains isolated in cultures and wild salmonids to various chemotherapeutics. Bull Japanese Soc Sci Fisheries 1983;49:17-22.
10. Watanabe T A, Ogata Y, Egusa S. R factors related to fish culturing. Ann N Y Acad Sci 1971;182: 383-410.
11. Hayasi F, Araki Y, Harada L, Inoe M, Mtsuhashi S. Epidemiological studies of drugs resistance strains in cultured fish and water. Bull Jpn Soc Sci Fisheries 1982;48:1121-1127.
12. Toranzo A E, Barja J L, Colwell R R, Hetrick F L. Relationship between plasmid strain of *Vibrio anguillarum* isolated from different fish species. Appl Environ Microbiol 1983;55:826-831.
13. Hedges R W, Smith P, Brazil G. Resistance Plasmid

asociaron con *V. fluvialis* y *V. furnissii*.

Las cepas de colección empleadas en este trabajo presentaron sólo plásmidos con peso molecular de 25.7 kb, a diferencia de los descritos por Giles *et al.*³⁵ para las cepas de *A. salmonicida* (ATCC33658) y *V. ordalii* (ATCC33509), que portaban varios plásmidos de niveles bajos de pesos moleculares

La manifestación de resistencia a antibióticos en todas las cepas y un alto porcentaje de éstas, a siete de los antibióticos probados, indican la aplicación de control químico, por antibióticos, desconociendo por parte de los acuacultores, la especificidad del patógeno que está infectando al cultivo, así como la especificidad del antibiótico necesario para controlar al agente causal y la dosis necesaria. Se intenta fallidamente el uso de un antibiótico tras otro. Al final se obtuvo un lote de peces infectados crónicamente, portadores de bacterias resistentes a la mayoría de los antibióticos más empleados y un ambiente contaminado de químicos que inducirán a la formación de plásmidos resistentes de las bacterias que se encuentren en ese espacio ambiental, y que puedan ser patógenas para otra especie, incluyendo al ser humano.

La presencia de más de un plásmido indica el empleo de varios antibióticos en el intento de controlar la infección detectada en los lotes de peces empleados en este estudio. Por otro lado, es un indicador de que a la granja muestreada ingresaron lotes diferentes de peces, por la diferencia de los plásmidos extraídos, sugiriendo que esos peces ingresaron siendo portadores de bacterias resistentes, y que al variar las condiciones ambientales se manifestaron como patógenas y recibieron nuevamente dosis de diferentes antibióticos.

Los plásmidos obtenidos en este estudio presentaron incapacidad de establecer transferencia a *E. coli*, no perteneciendo, por tanto, a ninguno de los grupos C o U de incompatibilidad.¹⁵

Sin embargo, son necesarias restricciones legales en el uso de antibióticos para prevenir y controlar infecciones en la acuacultura, ya que contribuirían para disminuir la formación y dispersión de plásmidos-R en otras especies que sí presentarían tal capacidad.

- of *Aeromonas*. J Gen Microbiol 1985;131:2091-2095.
14. Bast L, Daly F G, De Grandis S A, Stevenson R M W. Evaluation of profiles of *Aeromonas salmonicida* epidemiological markers of furunculosis infection in fish J Fish Dis 1988;11:133-145.
15. Hedges R W, Datta N. R-factors giving chloramphenicol resistance. Nature 1971;234:220-221.
16. Son R, Rusul G, Sahilah A M, Zainuri A, Raha A R, Salmah I. Antibiotic resistance and plasmid profile of *Aeromonas hydrophila* isolates from cultures fish, *Telapisi* (*Telapia mossambica*). Lett Appl Microbiol 1997;24:479-482.
17. Negrete R P, Romero J J. Estudio cualitativo de las

Capacidad de *Vibrio fluvialis* (Lee, 1981) para producir infección en pez dorado (*Carassius auratus*, L.)

Capacity of *Vibrio fluvialis* (Lee, 1981) to produce disease in goldfish (*Carassius auratus*, L.)

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

Abstract

Specimens of *Carassius auratus* were injected intramuscularly with different infective doses of *Vibrio fluvialis* to prove the capacity of this pathogen for generating diseases in aquatic organisms, as well as to establish the corresponding LD₅₀ and to know whether these bacteria have the capacity to infect the cultivated fish through water from ponds, or if a live host is needed to produce infection. The etiological relationship between *V. fluvialis* and its host was established. Concurrently, the clinical forms of this infection were characterized as archetypical response, i.e. focal dermomyonecrosis concomitant with acute bacterial septicemia. The signs and lesions were a particular feature of vibriosis and furunculosis. This pathogen was unable to generate disease when the infection was experimentally induced through water from aquaria.

Keys words: BACTERIAL INFECTION, EXPERIMENTAL TRANSMISSION, ORNAMENTAL FISH, *VIBRIO FLUVIALIS*, *CARASSIUS AURATUS*.

Resumen

A algunos peces de ornato de la especie *Carassius auratus* se les inyectó, vía intramuscular, diferentes dosis infectivas de la bacteria *Vibrio fluvialis* con el fin de probar la capacidad de ésta para producir infección en organismos acuáticos, establecer su correspondiente DL₅₀ y determinar si esta bacteria puede infectar los individuos cultivados a través del agua de los estanques de cultivo, o si necesita de un hospedero vivo para transmitir y producir infección. Se estableció la relación etiológica entre *Vibrio fluvialis* y su huésped, el cuadro clínico obtenido fue caracterizado como respuesta arquetípica parecida a una dermomyonecrosis ulcerativa con septicemia aguda. Los signos y lesiones fueron característicos de vibriosis y furunculosis. Se comprobó que esta especie bacteriana no posee la capacidad de ser transmitida vía el agua de los acuarios.

Palabras clave: INFECCIÓN BACTERIANA, TRANSMISIÓN EXPERIMENTAL, PECES DE ORNATO, *VIBRIO FLUVIALIS*, *CARASSIUS AURATUS*.

Recibido el 27 de febrero de 2003 y aceptado el 30 de septiembre de 2003.

* Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calz. del Hueso 1 100, Col. Villa Quietud, México, D. F.

** Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

*** Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, 09340, México, D.F.

Cuadro 1
GRUPO TESTIGO DE PECES *Carassius auratus* INOCULADOS CON SOLUCIÓN SALINA ESTÉRIL.
CARACTERIZACIÓN DIAGNÓSTICA

Characteristic	Fish 1	Fish 2	Fish 3	Fish 4	Fish 5	Fish 6	Fish 7	Fish 8	Fish 9	Fish 10
Color	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Skin	Edema	Edema	Edema	Edema	Edema	Edema	Edema	Edema	Edema	Edema
Scales	Bristle	Bristle	Bristle	Bristle	Bristle	Bristle	Bristle	Bristle	Bristle	Bristle
Fins and tail	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Mouth	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Branchia	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Eyes	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Body	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Appetite	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia
Behavior	Nervous	Nervous	Nervous	Nervous	Nervous	Nervous	Nervous	Nervous	Nervous	Nervous
Feces	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Swimming	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Secretions	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

*No signs were

Cuadro 2

CARACTERIZACIÓN DE SIGNOS Y LESIONES DE INFECCIÓN EN PECES *Carassius auratus auratus* INOCULADOS CON 107 UIC/M

CHARACTERIZATION OF SIGNS AND LESIONS IN CARASSIUS *auratus auratus* FISH INOCULATED WITH 107 UIC/M

Characteristic	DIAGNOSTIC CHARACTERIZATION										
	Fish 1	Fish 2	Fish 3	Fish 4	Fish 5	Fish 6	Fish 7	Fish 8	Fish 9	Fish 10	
Color	*	*	*	*	*	*	*	Opaque	Opaque	*	Opaque
Skin	*	*	*	*	*	*	*	Edema necrosis	Edema necrosis	*	Edema necrosis
Scales	*	*	*	*	*	*	*	Desquamation	Desquamation	Desquamation	Desquamation
Fins and tail	Retracted	Retracted	Retracted	Retracted	Retracted	Retracted	Retracted	Retracted	Retracted	Retracted	Retracted
Mouth	Gasping abnormal	Gasping abnormal	Gasping abnormal	Gasping abnormal	Gasping abnormal	Gasping abnormal	Gasping abnormal	Gasping abnormal	Gasping abnormal	Gasping abnormal	Gasping abnormal
Branhia	Operculum open *	*	*	*	*	*	Breathing abnormal	Breathing abnormal	Breathing abnormal	Breathing abnormal	Breathing abnormal
Eyes	Exophthalmus	Exophthalmus	Exophthalmus	Exophthalmus	Exophthalmus	Exophthalmus	Exophthalmus	Exophthalmus	Exophthalmus	Exophthalmus	Swollen
Body	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen
Appetite	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia
Behavior	Immobile	Immobile	Immobile	Immobile	Immobile	Immobile	Immobile	Immobile	Immobile	Immobile	Immobile
Feces	No defecation	No defecation	No defecation	No defecation	No defecation	No defecation	No defecation	No defecation	No defecation	No defecation	No defecation
Swimming	Erratic	Erratic	Erratic	Erratic	Erratic	Erratic	Erratic	Erratic	Erratic	Erratic	Erratic
Secretions	Mucosity	Mucosity	Mucosity	Mucosity	Mucosity	Mucosity	Mucosity	Mucosity	Mucosity	Mucosity	Mucosity
Mouth	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Skin	*	*	*	*	*	*	Desquamation	Desquamation	Desquamation	*	*
Digestive tract	Swollen	Swollen	Swollen	Swollen	Swollen	Swollen	Swollen	Swollen	Swollen	Swollen	Swollen
	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Swollen	Swollen	Swollen	Swollen	Swollen	Swollen	Swollen
	Hemorrhage	Hemorrhage	Hemorrhage	Hemorrhage	Swollen	Swollen	Swollen	Swollen	Swollen	Swollen	Swollen
Kidney	Destroyed	Destroyed	Destroyed, edema	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed
Liver	Swollen	Swollen	*	*	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed
Gallbladder and spleen	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Swimming bladder	*	*	*	*	*	*	*	Destroyed	Destroyed	*	*
Gonads	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Muscle	Necrosis	*	*	*	*	Necrosis	Necrosis	Necrosis	Necrosis	Necrosis	Necrosis
Smell	*	*	*	*	*	*	*	Unpleasant	*	*	*

* No signs were shown

Cuadro 3
 CARACTERIZACIÓN DE SIGNOS Y LESIONES EN PECES *Carrasius auratus* INOCULADOS CON 106 ufc/ ml
 CARACTERIZACIÓN DIAGNÓSTICA

CHARACTERIZATION OF SIGNS AND LESIONS IN *Carrasius auratus* FISH INOCULATED WITH 106 cfu/ ml

Characteristic	Fish 1	Fish 2	Fish 3	Fish 4	Fish 5	Fish 6	Fish 7	Fish 8	Fish 9	Fish 10
Color	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Skin	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Scales	Desquamation	*	Desquamation	Desquamation	Desquamation	Desquamation	*	Desquamation	Desquamation	Desquamation
Fins and tail	Eroded	Eroded	Eroded	Hemorrhage	Hemorrhage	Hemorrhage	Hemorrhage	Hemorrhage	Hemorrhage	Hemorrhage
Mouth	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Branchia	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Eyes	Exophthalmus	Exophthalmus	Exophthalmus	Exophthalmus	Exophthalmus	Exophthalmus	Exophthalmus	Exophthalmus	Exophthalmus	Exophthalmus
Body	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen
Appetite	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia
Behavior	Abnormal	Abnormal	Abnormal	Abnormal	Abnormal	Abnormal	Abnormal	Abnormal	Abnormal	Abnormal
Feces	Not observed	Not observed	Not observed	Not observed	Not observed	Not observed	Not observed	Not observed	Not observed	Not observed
Swimming	Erratic	Erratic	Erratic	Erratic	Erratic	Erratic	Erratic	Erratic	Erratic	Erratic
Secretions	Mucosity	Mucosity	*	Mucosity	Mucosity	*	Mucosity	Erratic	Mucosity	Erratic
Mouth	Hemorrhage	*	*	*	*	*	*	*	*	Hemorrhage
Skin	Mucosity	Desquamation	Not observed	Mucosity	Mucosity	Not observed	Not observed	Not observed	Not observed	Not observed
Digestive tract	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed
Kidney	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed
Liver	Destroyed	Necrotic	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed
Gallbladder and spleen	Swollen	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Swimming bladder	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Gonads										
Muscle										
Smell	Unpleasant	Unpleasant	*	*	*	Unpleasant	Unpleasant	*	Unpleasant	*

* No signs were shown

Cuadro 4

CARACTERIZACIÓN DE SIGNOS Y LESIONES DE PECES DE ORNATO *Carrasius auratus* INOCULADOS CON 105 ufc/ml
 CHARACTERIZATION OF SIGNS AND LESIONS IN *Carrasius auratus* FISH INOCULATED WITH 105 cfu/ml

Characteristic	DIAGNOSTIC Characterization										
	Fish 1	Fish 2	Fish 3	Fish 4	Fish 5	Fish 6	Fish 7	Fish 8	Fish 9	Fish 10	
Color	Opaque	Opaque	*	*	*	Reddened	Reddened	Reddened	Reddened	Reddened	
Skin	Edema	Edema	*	Edema	*	Edema	Edema	*	Edema	*	
Scales	*	*	*	*	Desquamation	Desquamation	*	*	*	*	
Fins and tail	*	*	*	Eroded	*	*	*	*	*	*	
Mouth	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Branchia											
Eyes	Exophthalmus	Turbid	*	*	Turbid	Turbid	Turbid	Turbid	*	*	
Body	Abdomen swollen	*	*	*	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	*	
Appetite	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	
Behavior	Abnormal	Abnormal	Abnormal	*	Abnormal	Abnormal	Abnormal	Abnormal	Abnormal	Abnormal	
Feces	Diarhea	Diarhea	*	Diarhea	Diarhea	Diarhea	Diarhea	Diarhea	Diarhea	Diarhea	
Swimming	Erratic	Erratic	Erratic	*	Erratic	*	*	Erratic	*	Erratic	
Secretions	Mucosity	Mucosity	*	*	Mucosity	Mucosity	Mucosity	*	Mucosity	*	
Mouth	*	*	*	*	NECROPSIES						*
Skin	Desquamation	Desquamation	*	*	*	*	*	Desquamation	*	*	
Digestive tract					Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	
Kidney	Destroyed	Destroyed		Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	
Liver	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	
Gallbladder and spleen	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Swimming bladder	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Gonads	*	*	Damaged	Damaged	*	*	*	*	*	*	
Muscle	*	*	Swollen	Reddened	*	Necrotic	Swollen	*	Swollen	Swollen	
Smell	Unpleasant	Unpleasant	Unpleasant	*	Unpleasant	Unpleasant	Unpleasant	*	*	*	

* No signs were shown

Cuadro 6

CARACTERIZACIÓN DE SIGNOS Y LESIONES DE PECES DE ORNATO *Carassius auratus auratus* INOCULADOS CON 103 ufl/ml
 CARACTERIZACIÓN DIAGNÓSTICA

CHARACTERIZATION OF SIGNS AND LESIONS IN *Carassius auratus auratus* FISH INOCULATED WITH 103 cfu/ml

Characteristic	Fish 1	Fish 2	Fish 3	Fish 4	Fish 5	Fish 6	Fish 7	Fish 8	Fish 9	Fish 10
Color	*	*	*	*	*	Dark	Dark	Opaque	Opaque	Dark
Skin	*	*	*	*	*	Mycosis	Mycosis	*	Mycosis	Mycosis
Scales	*	Desquamation	Desquamation	Desquamation	*	*	Desquamation	*	*	Desquamation
Fins and tail	Eroded	Mycosis	Mycosis	*	Retracted	Eroded	Mycosis	*	*	*
Mouth	*	*	Gasping abnormal	*	Gasping abnormal	*	Gasping abnormal	Gasping abnormal	Gasping abnormal	Gasping abnormal
Branchia	Hemorrhage	*	Breathing abnormal	*	Breathing abnormal	*	Breathing abnormal	Breathing abnormal	Breathing abnormal	Breathing abnormal
Eyes	Exophthalmus	*	Exophthalmus	*	*	*	*	*	*	*
Body	Abdomen swollen	Hemorrhage	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen
Appetite	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia
Behavior	Nervous	Nervous	Nervous	Nervous	Nervous	Nervous	Nervous	Nervous	Nervous	Nervous
Feces										
Swimming	Erratic	*	*	*	*	Erratic	Erratic	Erratic	Erratic	Erratic
Secretions	*	*	*	*	*	Mucosity	*	Mucosity	*	Mucosity

* No signs were shown

19. Austin B, Austin DA. Bacterial fish pathogen diseases in farmed and wild fish. London: Ellis Horwood Ltd 1987.
20. Munro A L S. The pathogenesis of bacterial diseases of fishes. In Roberts R.J. editor Microbial diseases of fish London: Academic Press 1982; 131-149.
21. Michel C. A standardized of experimental furunculosis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Can J Fish Aqu Sci 1980; 37: 746-750.
22. Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. México. NOM- 121-PESCA-1994. DIARIO OFICIAL. 1995.
23. Negrete RP, Romero JJ. Inducción de bacteriosis en *Cyprinus carpio*, con bacterias aisladas de organismos enfermos cultivados en granjas piscícolas. Rev Hidrobiol 1998; 2: 1-10.
24. Analytical Profile Index. Enterobacteriaceae and other Gram negative Bacteria. 9th ed. France BioMérieux, 1997.
25. Analytical Profile Index. Enterobacteriaceae and other Gram negative Bacteria 2th ed. France BioMérieux, 1989.
26. Dalsgaard I, Gudmundsdottir BK, Helgason S, Hoies S, Thoresen OF, Wichardt T, et al. Identification of atypical *Aeromonas salmonicida*: Interlaboratory Evaluation and harmonization of methods. J Appl Microbiol 1998; 84, 999-1006.
27. Altwegg M, Steigerwalt A G, Altwegg-Bissig R, Luthy-Hottenstein J, Brenner D J. Biochemical Identification of *Aeromonas Genospecies* Isolated from Humans Am Soc Microbiol 1990; 28(2): 258-264.
28. Colwell RR, Mc Donell M T, De Ley J. Proposal to recognize the family Acromonadaceae. Fam. nov. Int. J Syst Bacteriol 1986; 36: 473-477.
29. Furniss A L, Lee J V, Donovan T S. Group F, a new *Vibrio*? Lancet II 1977 565-566.
30. Cowan S T. Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1974.
31. Cappuccino G J, Sherman N D. Microbiology. A laboratory Manual 4th ed. The Benjamin /Cummings publishing, Inc, 1996.
32. APHA. Standard Methods for examination of water and wastewater. 17th ed. Washington D C. Am Public Health Assoc 1992.
33. Reed L J, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am J Hyg 1938, 27: 493-497.
34. Hjeltnes B, Roberts J R. Vibriosis in bacterial diseases of fish. New York: Ed. Inglis W, Roberts R J, Bromage 1993.
35. Michel C. Development of bacterial in fish and in water during a standardized experimental infection of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) with *Aeromonas salmonicida*. In: Roberts R J. editor Microbial diseases of fish. London: Academic Press, 1982.