

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**CARACTERIZACIÓN DEL CUADRO CLÍNICO, LEUCOGRAMA
DIFERENCIAL Y HALLAZGOS DE NECROPSIA EN TILAPIAS
NILÓTICAS (*OREOCHROMIS NILOTICUS*) INFECTADAS
EXPERIMENTALMENTE CON *AEROMONAS HYDROPHILA*
(BACTERIA: AEROMONADACEAE)**

por

ESCANDELL Claudio

SANCHEZ Pablo

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias

Orientación: Higiene, inspección, control y
tecnología de los alimentos de origen
animal

MODALIDAD Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2017**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

Dr. Daniel Carnevia.

Segundo miembro (Tutor):

Dr. Alejandro Perretta.

Tercer miembro:

Dra. Maite Letamendía.

Fecha:

Lunes 24 de abril de 2017.

Autores:

Br. Claudio Escandell

Br. Pablo Sánchez

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer en primer lugar al Dr. Alejandro Perretta por su gran labor como nuestro tutor para lo cual nos dedicó mucho de su tiempo y compartió conocimientos que nos ayudaron a elaborar esta tesis.

A los compañeros del Área Acuicultura y Patología de Organismos Acuáticos del Instituto de Investigaciones Pesqueras, en especial a su jefe de Área el Dr. Daniel Carnevia por su amabilidad y generosidad quien desde un principio dejó a nuestra disposición el uso de las instalaciones del lugar que nos permitió realizar el trabajo experimental.

A la empresa GADASUR S.A. por el aporte de los peces que se emplearon en este estudio.

A nuestras familias por el apoyo y esfuerzo realizado durante estos años para que logremos formarnos como profesionales.

A los amigos y compañeros de facultad con los cuales hemos compartido tantas vivencias juntos durante los años de clases.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	6
RESUMEN.....	7
SUMMARY.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
▪ ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	9
▪ LOS AEROMONADALES MÓVILES.....	9
▪ IMPORTANCIA DE LA TILAPIA.....	12
HIPÓTESIS.....	13
OBJETIVO GENERAL.....	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
▪ ORIGEN Y MANTENIMIENTO DE LOS PECES.....	15
▪ ORIGEN DE LAS BACTERIAS Y CONFECCIÓN DEL INOCULO.....	15
METODOLOGÍA.....	16
▪ INFECCIÓN EXPERIMENTAL.....	16
REGISTROS DE SIGNOS CLÍNICOS Y MUESTREO DE LOS ANIMALES.....	16
CONTEO DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS.....	16
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	17
RESULTADOS.....	18

DISCUSIÓN.....	22
▪ SIGNOS CLÍNICOS.....	22
▪ LEUCOGRAMA DIFERENCIAL.....	23
▪ HALLAZGOS DE NECROPSIA.....	25
CONCLUSIONES.....	26
BIBLIOGRAFÍA.....	27

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

- Tabla 1.** Frecuencia de observación de signos clínicos (en %) en tilapias nilóticas (*Oreochromis niloticus*) infectadas experimentalmente con *Aeromonas hydrophila* por vía intraperitoneal.....pag.18.
- Tabla 2.** Leucograma diferencial (en %) llevado a cabo en tilapias nilóticas (*Oreochromis niloticus*) infectadas experimentalmente con *Aeromonas hydrophila*.....pag.19.
- Tabla 3.** Frecuencia de observación (en %) de hallazgos de necropsia en tilapias nilóticas (*Oreochromis niloticus*) infectadas experimentalmente con *Aeromonas hydrophila*.....pag.20.
- Figura 1.** Microfotografía de frotis de sangre de tilapia. Se observan dos neutrófilos y un monocito junto a un gran número de eritrocitos (tinción de Giemsa 1000X).....pag.19.
- Figura 2.** Microfotografía de frotis de sangre en la cual se evidencian tres neutrófilos dispersos entre los eritrocitos (tinción de Giemsa 1000X).....pag.20.
- Figura 3.** Aspecto de los órganos de la cavidad abdominal de tilapias nilóticas (*Oreochromis niloticus*) infectadas experimentalmente con *Aeromonas hydrophila* por vía intraperitoneal.....pag.21.
- Figura 4.** Neutrófilos de tilapia fagocitando células de *Aeromonas hydrophila* (tomado de Ainsworth., 1992).....pag.24.

RESUMEN

Aeromonas hydrophila es un bacteria oportunista asociada con el desarrollo del síndrome conocido como Septicemia por *Aeromonas* Móviles. Esta patología ha adquirido gran importancia para la acuicultura en las últimas décadas debido a las grandes pérdidas económicas que provoca, además de su incidencia en la salud pública dado que es una enfermedad zoonótica. Este microorganismo ha sido identificado en nuestro país, no solo afectando tilapias (especie utilizada en nuestra experiencia) sino que también en una variada cantidad de otras especies de peces. A pesar de la importancia de ésta patología, existe escasa información con respecto a las características del cuadro clínico y anatomopatológico, no solo en especies locales sino también en peces tropicales ornamentales. En nuestro trabajo se evaluó el efecto de la infección experimental con *Aeromonas hydrophila* sobre la manifestación de signos clínicos y el recuento diferencial de leucocitos en tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*), así como también se registraron los principales hallazgos de necropsia observados en los animales infectados. Para esto se realizó una infección experimental por vía intraperitoneal con una dosis bacteriana equivalente a la dosis letal cincuenta en 96 horas determinada previamente para dicho aislamiento de *A. hydrophila*. A las 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 y 180 horas posinfección se evaluaron los signos clínicos expresados por la totalidad de los peces y se sacrificó un número representativo de animales para la colecta de sangre y realización de necropsias. La mayoría de los signos clínicos fueron evidenciados a partir de las 48 horas post infección. Se destaca el desarrollo de signos inespecíficos como anorexia, letargia y cambio de coloración en los animales infectados experimentalmente. En el leucograma diferencial se pudo apreciar una considerable disminución de linfocitos y un aumento de neutrófilos y basófilos a partir de las 24 horas post infección. Entre los hallazgos de necropsia más frecuentes se destacan: bazo e hígados congestivos y friables, gas y contenido serosanguinolento en el tracto gastrointestinal. Mediante la infección experimental por vía intraperitoneal de tilapias (*Oreochromis niloticus*) por *Aeromonas hydrophila* se pudo lograr el desarrollo de un cuadro patológico típico de septicemia por *Aeromonas* móviles.

SUMMARY

Aeromonas hydrophila is an opportunistic bacteria associated with the development of the syndrome known as Motile Aeromonas Septicemia. This pathology has acquired great importance for the aquaculture in the last decades due to the great economic losses that it causes, besides its incidence in the public health since it is a zoonotic disease. This microorganism has been identified in our country, not only affecting tilapias (a species used in our experience) but also in a varied amount of other species of fish. In spite of the significance of this pathology, there is little information regarding the characteristics of the clinical signs and pathological anatomy, not only in local species but also in tropical ornamental fish. In our study, the effect of the experimental infection with *Aeromonas hydrophila* on clinical signs and differential leukocyte count in niloticus tilapia (*Oreochromis niloticus*) was evaluated, as well as the main necropsy findings observed in infected animals. For this, an experimental infection was performed intraperitoneally with a bacterial dose equivalent to the fifty lethal dose in 96 hours previously determined for said isolation of *A. hydrophila*. At 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 and 180 hours post infection the clinical signs expressed by all fish were evaluated and a representative number of animals were sacrificed for blood collection and necropsies. Most of the clinical signs were evident after 48 hours post infection. The development of nonspecific signs such as anorexia, lethargy and color change in experimentally infected animals is highlighted. Differential leukogram showed a significant decrease in lymphocytes and an increase in neutrophils and basophils after 24 hours post infection. Among the most frequent necropsy findings are: congestive spleen, friable liver, gas and serous-bloody content in the gastrointestinal tract. The experimental infection with *Aeromonas hydrophila* by the intraperitoneal route of tilapias (*Oreochromis niloticus*) could lead to the development of a typical pathology of septicemia by mobile *Aeromonas*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes históricos

Se considera que la primera descripción de una bacteria del género *Aeromonas* fue la realizada por Sanarelli en 1891, durante un estudio de inmunidad en ranas en el que muchas de éstas desarrollaron una septicemia que se atribuyó a *Bacillus hydrophilus fuscus*.

Durante aquella época se aislaron *Aeromonas* de agua, peces enfermos y leche. (Farmer y col, 2006).

Desde el primer aislamiento hasta 1943, año en el que se definió el género (Stanier, 1943), los aeromonadales fueron incluidos en diversos grupos como *Achromobacter*, *Bacillus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, entre otros. De hecho, la definición del género *Aeromonas* se ha atribuido erróneamente a Kluver and van Niel (1936) en numerosos manuales de microbiología, a pesar de que la comisión judicial del comité internacional de sistemática de bacteriología (1973) estableció la autoría a Stanier, 1943.

1.2 Los aeromonadales móviles

El género *Aeromonas* (del griego: *aer*, gas; *monas*, unidades; unidades productoras de gas), de acuerdo con la edición más reciente del Manual de Bergey, pertenece a la clase Gammaproteobacterias, orden Aeromonadales, familia *Aeromonadaceae*, que en la actualidad incluye 3 géneros: *Aeromonas*, *Oceanimonas* y *Tulomonas*. (Martin Carnahan y Joseph, 2005).

Aeromonas hydrophila es un bacilo Gram negativo, móvil, anaerobio facultativo, habitante normal del agua y del tracto gastrointestinal de animales acuáticos y terrestres (Rodríguez y col., 2005). Afecta a muchas especies de peces, donde causa una patología conocida como Septicemia por *Aeromonas* móviles (SAM), la enfermedad bacteriana más prevalente en la acuicultura mundial de agua dulce (Paniagua y col., 1990).

Estudios de hibridación ADN-ARN demostraron que *A. hydrophila* es un complejo específico genéticamente muy variable lo que hace que la identificación y caracterización de cepas sea un aspecto difícil (Janda, 1991).

Aeromonas spp. se clasifican en dos grupos, definidos esencialmente en base a la temperatura de crecimiento *in vitro* y la motilidad. Estos dos grupos son los siguientes:

- *Aeromonas* mesófilas (crecimiento óptimo a 35-37°C, móviles) responsables de diversas infecciones en humanos y animales.
- *Aeromonas* psicrófilas (crecimiento óptimo a 22-28°C, inmóviles) representadas por *A. salmonicida*, responsable de la forunculosis de los salmones.

El grupo de las *Aeromonas* mesófilas, móviles debido a la presencia de un flagelo polar único, es considerado potencialmente peligroso para la salud humana y está formado por las especies *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii* entre otras especies (Bartram J. y col., 2003).

Aeromonas hydrophila es un patógeno oportunista capaz de desarrollar un proceso infeccioso en los peces cuando las condiciones medioambientales (alta temperatura, exceso de materia orgánica) y los predisponentes animales (inmunosupresión, estrés, subnutrición) son los adecuados.

Los aeromonadales móviles son capaces de invadir heridas de piel comunes en infecciones fúngicas como Saprolegniasis y heridas por ectoparásitos (Noga, 1986).

Las *Aeromonas* móviles, a su vez, son comúnmente aisladas de la superficie y órganos internos de peces clínicamente sanos (Hazen y col., 1978; Avault, 1995).

Todos los peces de agua dulce son probablemente susceptibles al desarrollo de SAM. Aunque las *Aeromonas* móviles también pueden habitar aguas salobres (Hazen y col., 1978), disminuyendo su prevalencia con el aumento de la salinidad (Kaper y col., 1981).

En nuestro país se ha identificado a *Aeromonas hydrophila* como una de las bacterias más comúnmente involucradas en procesos infecciosos de peces de cultivo (Carnevia y col., 2010).

Estas bacterias oportunistas forman parte de la flora intestinal normal de peces y otros animales acuáticos; así que la presencia de estas, no es indicativo de enfermedad, factores ambientales y fisiológicos asociados a estrés contribuyen a la presentación de brotes de enfermedad y en consecuencia a altas pérdidas económicas dentro de los cultivos de peces (Cipriano, 2000).

La patogénesis de la Septicemia por *Aeromonas* móviles es multifactorial y puede involucrar el producto de numerosos y diferentes genes que actúan individual y conjuntamente, codificando la síntesis de diferentes factores de virulencia y permitiendo a las bacterias invadir las células del hospedero y diseminarse vía sanguínea a diferentes órganos (Chopra y col., 1999).

La característica principal de la patogénesis inducida por esta bacteria bien como agente primario o secundario, es la diseminación en forma de bacteriemia, seguida por la elaboración de toxinas y enzimas (endotoxinas, enterotoxinas extracelulares, hemolisinas, citotoxinas y proteasas) que desembocan en el desarrollo de procesos hemodinámicos y tóxicos generalizados (Brenden & Huizinga, 1986; Inglis, 1993).

Entre las lesiones características de SAM se incluyen: hiperemia de capilares, exudación, hemorragias petequiales focales y leucocitosis, que son acompañada generalmente por niveles importantes de macrófagos circulantes

pigmentados derivado de centros melanomacrófagos, así como de exoftalmia asociada con edema preorbital (Roberts, 1989).

El periodo de incubación de la enfermedad depende de la especie del pez y su resistencia, condiciones ambientales y época del año, entre otros factores. El periodo varía de 2-4 días en infecciones naturales y 8-48 hs en infecciones experimentales (Huizinga y col., 1979).

Se pueden reconocer tres formas clínicas de SAM teniendo en cuenta la sintomatología y lesiones asociadas (Carnevia y col., 2010):

- Aguda Septicémica,
- Subaguda Ascítica
- Crónica Ulcerosa

La forma más común es la Aguda Septicémica (63,1 % de los casos), la que suele cursar con ectoparasitosis severas y presentar alta morbilidad y mortalidad, con escasos signos clínicos. En la forma sobreaguda de la enfermedad puede sobrevenir la muerte sin signos premonitorios o desarrollarse un proceso ascítico en los animales afectados. En algunos casos también se puede observar pérdida de escamas y hemorragias focalizadas en las branquias, boca y base de las aletas. La forma crónica ulcerosa es menos común que las anteriores, puede cursar con úlceras en la piel, exoftalmia y ascitis que distiende el abdomen. En casos muy prolongados se observan lesiones renales y hepáticas. (Stoskopf, 1993; Grizzle & Kiryu, 1993).

La cría intensiva de peces permite el desarrollo de condiciones favorables para las infecciones, como sobrepoblación y factores ambientales adversos (aumento de materia orgánica y disminución del oxígeno disuelto). Estos factores influyen en la reducción de la resistencia de los peces y favorecen la acción patógena de *A. hydrophila* y de otras bacterias (Acha & Szyfres., 2001).

Cepas de *A. hydrophila* y otras especies del género aisladas de procesos infecciosos, poseen diferentes genes que intervienen en la patogenicidad de esta bacteria como los son: la serina proteasa, asociada con la activación de la aerolisina; el colesterol aciltransferasa GCAT (por sus siglas en inglés); genes codificadores de lipasa como *plc*, *lipH3*, *pla*, *lip* y genes de DNasa (Chacón, 2003).

Además se ha determinado la producción de una variedad de productos extracelulares (PEC) biológicamente activos, como enterotoxinas citotóxicas que causan un daño importante en el epitelio, principalmente de intestino (Vázquez y col., 2010).

1.3 Importancia de la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*)

La acuicultura actualmente aporta el 47% de todo el pescado destinado al consumo humano, en cambio la producción de la pesca de captura se ha estabilizado y no se espera que aumente por encima de los niveles actuales. En América Latina, los principales productos acuícolas son los salmónidos y el camarón, con un interesante crecimiento de la tilapia (FAO, 2014). El desarrollo de la acuicultura de tilapia en la región abre oportunidades para desarrollar actividades como proveedor de insumos, producción de alevines y engorde. El Estado uruguayo definió como una política pública el desarrollo de la acuicultura (Carnevia, 2010).

Oreochromis niloticus pertenece a la familia Cichlidae dentro del orden Perciformes. Si bien su origen es africano, a mediados del siglo XX se introdujo en todas partes del mundo, debido a su valor comercial y el consumo a nivel familiar. Toleran altos niveles de salinidad, lo que les permite vivir en aguas dulces, salobres o marinas. El rango de tolerancia térmica va de 12°C a 42°C, estando la temperatura ideal para su cultivo es en el entorno de los 29°C.

La tilapia es una de las especies más cultivadas en el mundo debido a su buen sabor y rápido crecimiento, a la capacidad de crecer en estanques y en jaulas, soportar altas densidades, resistir condiciones ambientales adversas y tolerar bajas concentraciones de oxígeno. Actualmente se cultivan con éxito unas diez especies. Como grupo las tilapias representan uno de los peces más ampliamente producidos en el mundo. Las especies más cultivadas son *Oreochromis aureus*, *O. niloticus* y *O. mossambicus* (Wakefield y col., 2014)

No se ha establecido concretamente una predisposición genética de la tilapia (*Oreochromis niloticus*) a la infección por *Aeromonas* móviles pero si se han determinado que condiciones estresantes como alta densidad poblacional y bajo nivel de oxígeno en el ambiente donde se hallan los peces favorecen a la aparición de patologías infecciosas entre ellas *Aeromonas* spp. (Austin & Austin, 1999).

A pesar de la importancia de ésta enfermedad para la producción de una de las especies de peces que más se cultiva en el mundo, existe poca información generada en aspectos tales como el desarrollo y caracterización del cuadro clínico de la enfermedad y su evolución en el tiempo, así como también de la respuesta hemática a la infección con este grupo de bacterias.

2. HIPÓTESIS

Las tilapias (*Oreochromis niloticus*) infectadas experimentalmente con *Aeromonas hydrophila* por vía intraperitoneal desarrollarán un cuadro de septicemia por *Aeromonas* móviles

3. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el cuadro clínico, leucograma diferencial y hallazgos de necropsia en tilapias nilóticas (*Oreochromis niloticus*) infectadas experimentalmente por vía intraperitoneal con *Aeromonas hydrophila* (Bacteria: Aeromonadaceae).

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.1.1 Desarrollar un protocolo de infección experimental con *Aeromonas hydrophila* en tilapias nilóticas (*Oreochromis niloticus*) de manera tal de lograr reproducir un cuadro de Septicemia por *Aeromonas* móviles en esta especie.
- 3.1.2. Describir el cuadro clínico de los animales infectados experimentalmente mediante el registro periódico de los síntomas desarrollados por los peces.
- 3.1.3. Caracterizar el leucograma diferencial de los animales infectados experimentalmente en distintos instantes pos infección.
- 3.1.4. Describir las lesiones macroscópicas observadas a la necropsia de los peces infectados experimentalmente.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluó el efecto de la infección con *Aeromonas hydrophila* sobre la expresión de signos clínicos y el recuento diferencial de leucocitos en tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*), así como también se registraron los principales hallazgos de necropsia observados en los animales infectados. Para ello se llevó a cabo una infección experimental por vía intraperitoneal con una dosis bacteriana equivalente a la dosis letal cincuenta en 96 horas determinada previamente para dicho aislamiento de *A. hydrophila*. A las 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 y 180 horas posinfección se evaluaron los signos clínicos expresados por la totalidad de los peces y se sacrificó un número representativo de animales para la colecta de sangre y realización de necropsias.

4.1. Origen y mantenimiento de los peces

Se emplearon cuarenta alevines de la especie *Oreochromis niloticus* criados en un establecimiento de piscicultura con fines comerciales. Todos los animales provinieron de un mismo desove para asegurar homogeneidad genética.

El peso promedio de los ejemplares juveniles utilizados al momento de la experiencia fue de 108,15 gramos y una longitud promedio de 17,58 cm.

Los animales que fueron infectados se dividieron en dos grupos de quince peces cada uno los cuales fueron alojados en acuarios de vidrio de 100 litros cada uno con aireación constante, filtro biológico-mecánico y a una temperatura del agua de entre 25 y 26 °C. A su vez se mantuvieron en idénticas condiciones un grupo de diez peces que sirvieron de control durante las experiencias.

En todos los casos se realizó un recambio de agua diario equivalente a un tercio del volumen total de la pecera. Durante la experiencia de infección los animales se mantuvieron en ayuno, únicamente se les suministró alimento (*pellet* flotante) una vez al día para evaluar la presencia/ausencia de anorexia como síntoma asociado a la infección (el alimento fue retirado luego de evaluado el apetito de los animales).

4.2. Origen de las bacterias y confección del inóculo.

Se empleó un aislamiento de *Aeromonas hydrophila* existente en el banco de cepas del IIP proveniente de un episodio de mortalidad registrado en un establecimiento de acuicultura con fines comerciales.

Confección del inóculo: se tomó un cultivo puro de bacterias con 24 horas de crecimiento en caldo BHI, el cuál se centrifugó a 3500 rpm durante 30 minutos

y con el pellet resultante se realizó una re suspensión en PBS estéril hasta obtener una concentración final de $9,3 \times 10^8$ ufc.ml⁻¹ equivalente a una absorbancia de 1,4 a 600 nm de longitud de onda (dosis letal cincuenta en 96 horas calculada previamente para este aislamiento).

4.3. Metodología

4.3.1. Infección experimental:

A los peces separados en dos grupos experimentales (n=15) se les inyectó por vía intraperitoneal un volumen de 10 µl por gramo de peso vivo del inóculo bacteriano descrito previamente. El grupo control (n=10) fue inyectado con igual volumen de PBS estéril. Para las maniobras de pesado e inoculación los animales fueron sedados mediante baño de inmersión en una solución de 1ml de Eugenol (10%) por litro de agua según protocolo experimental descrito por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la UdelaR (CHEA, 2006).

4.4. Registro de signos clínicos y muestro de los animales

Los datos clínicos fueron recabados mediante observación directa de los individuos infectados y control. Se consideraron signos clínicos de relevancia a aquellos detectados por lo menos en una oportunidad durante un período de observación de cinco minutos por individuo a las 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 y 180 horas posinfección. Luego de la observación y previo al cambio de agua diario se evaluó el apetito de los peces mediante el suministro de *pellets* de ración comercial que luego de evaluada la conducta de los animales hacia el alimento eran retirados de las peceras.

Entre las 24 y 168 horas posinfección se sacrificaron cuatro animales de cada uno de los grupos con la finalidad de obtener datos de necropsia y extraer sangre para realizar frotis. Este muestreo se llevó a cabo cada 24 horas.

El sacrificio se realizó mediante sobredosis de anestésico en baño de inmersión (Eugenol al 10% en solución alcohólica) según protocolo aprobado por CHEA. La extracción de sangre se llevó a cabo mediante la punción de la vena caudal empleando jeringa hipodérmica de 1 ml.

4.5 Conteo diferencial de leucocitos

Ésta técnica de hematología consiste en determinar el porcentaje de cada una de los leucocitos existentes en una muestra sanguínea. Para ello se confeccionaron tres frotis de sangre por cada uno de los peces analizados. Cada lámina de frotis sanguíneo se dejó secar al aire, posteriormente fue fijada con metanol por evaporación para luego ser teñida durante treinta minutos con una solución de Giemsa diluida 1:50 en agua

destilada. El conteo se llevó a cabo en microscopio óptico con objetivo de inmersión a 1000x. Se contaron un mínimo de 300 leucocitos por lámina, registrándose a su vez las alteraciones morfológicas observadas y la presencia de otros tipos celulares (eritroblastos, trombocitos) por campo de observación. El conteo diferencial definitivo de cada animal analizado se tomó como el promedio entre las células observadas para cada una de las tres láminas confeccionadas.

4.6. Análisis estadístico

Se determinó la significancia estadística de las diferencias en las medianas de las frecuencias de observación de signos clínicos a diferentes horas posinfección con respecto al grupo control mediante el test estadístico de Kruskal-Wallis. Las diferencias observadas en las medianas de las frecuencias de conteo de cada uno de los grupos celulares evaluados se determinó empleando el mismo test estadístico, en todos los casos con un nivel de confianza del 0,05%.

Para llevar a cabo estos análisis se empleó el *software* Statgraphics Centurion XVI Versión 16.1.18 de StatPoint Technologies, con un nivel de confianza mínimo del 95%.

5. RESULTADOS

En la Tabla 1 presentan las frecuencias de observación de signos clínicos expresados (en %) por los animales infectados experimentalmente y su relación con el grupo control. Nótese que la mayoría de los signos clínicos son apreciables a partir de las 48 horas PI y se mantienen hasta el fin del período de observación.

Tabla 1. Frecuencia de observación de signos clínicos (en %) en tilapias nilóticas (*Oreochromis niloticus*) infectadas experimentalmente con *Aeromonas hydrophila* por vía intraperitoneal

	Horas posinfección (Hs PI)								Control (24 a 180 Hs PI)	Estadística
	24	48	72	96	120	144	168	180		
Aletas congestivas	0 ^a	7,4 ^b	7,4 ^b	16,0 ^c	19,1 ^c	22,4 ^c	17,6 ^c	12,5 ^c	0 ^a	KW:46,23; p<0,01
Aletas deshilachas	0 ^a	14,9 ^b	11,1 ^b	12,0 ^b	14,3 ^b	28,6 ^b	17,6 ^b	18,8 ^b	0 ^a	KW:20,31; p<0,05
Aletas replegadas	0 ^a	3,7 ^b	11,1 ^b	12,0 ^b	28,6 ^b	19,0 ^b	5,9 ^b	12,5 ^b	0 ^a	KW: 25,73; p<0,05
Ano protruido	0	0	0	4,0	4,8	4,8	5,9	12,5	0	KW: 11,04; p=0,6
Ano hemorrágico	0	0	0	4,0	0	0	0	0	0	KW: 11,72; p=0,5
Letargia	6,7 ^a	77,8 ^b	70,4 ^b	64,0 ^b	61,9 ^b	33,3 ^c	17,6 ^d	18,8 ^d	0 ^e	KW: 105,6; p<<0,01
Anorexia	0 ^a	66,7 ^b	59,3 ^b	32,0 ^c	42,9 ^b	28,6 ^c	0 ^a	0 ^a	0 ^a	KW: 78,53; p<<0,01
Cambio de coloración	13,3 ^a	44,4 ^b	40,7 ^b	36,0 ^b	47,6 ^b	52,4 ^b	17,6 ^a	31,3 ^b	0 ^c	KW: 35,2; p<0,01
Exoftalmia	0	0	0	4,0	4,8	0	5,9	6,3	0	KW: 10,05; p=0,7
Hemorragia periocular	0	3,7	3,7	4,0	0	4,8	0	0	0	KW: 8,56; p=0,8
Lepidortosis	0	0	0	0	0	0	5,9	6,3	0	KW: 17,95; p=0,15
Nado errático	0 ^a	0 ^a	14,8 ^b	12,0 ^b	14,3 ^b	0 ^a	17,6 ^b	12,5 ^b	0 ^a	KW: 36,5; p<0,01
Úlceras	0	0	0	4,0	4,8	4,8	0	0	0	KW: 8,6; p=0,8
Materia fecal oscura	0 ^a	0 ^a	18,5 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	50,0 ^c	0 ^a	KW: 96,3; p<<0,01
Hemorragia periopercular	0	4,8	4,8	0	13,3	14,8	0	0	0	KW: 23,61; p<0,05

KW: estadístico Kruskal-Wallis; ^{a≠b≠c≠d≠e} con p≤0,05 (comparación no válida entre distintos signos clínicos)

En la Tabla 2 se presentan los resultados correspondientes al leucograma diferencial llevado a cabo en los peces infectados y control en distintos instantes posinfección.

Tabla 2: Leucograma diferencial (en %) llevado a cabo en tilapias nilóticas (*Oreochromis niloticus*) infectadas experimentalmente con *Aeromonas hydrophila*

	Horas posinfección (Hs PI)							Control (24 a 168 Hs PI)	Estadística
	24	48	72	96	120	144	168		
Linfocitos	41,7±6,6 ^a	45±7,1 ^a	59,4±5,8 ^a	54,5±5,7 ^a	65,3±4,2 ^a	45,2±4,0 ^a	67,2±5,1 ^a	95,6±4,5 ^b	KW: 18,57; p<0,01
Neutrófilos	37,7±3,4 ^a	35,0±3,2 ^a	20,6±3,2 ^a	28,7±2,8 ^a	30,3±4,2 ^a	31,7±3,1 ^a	19,3±2,2 ^a	3,1±2,4 ^b	KW: 17,44; p<0,05
Basófilos	10,7±2,1 ^a	20±1,9 ^a	14±2,3 ^a	16,8±3,1 ^a	14,3±2,4 ^a	23±3,1 ^a	13,5±2,2 ^a	1,2±2,5 ^b	KW: 22,2; p<0,01
Eosinófilos	0	0	0	0	0	0	0	0	

KW: estadístico Kruskal-Wallis; ^{a≠b} con p≤0,05 (comparación no válida entre distintos tipos celulares)

En las Figuras 1 y 2 se pueden apreciar algunos de los elementos formes más representativos de la sangre de *O. niloticus* infectadas experimentalmente con *A. hydrophila*.

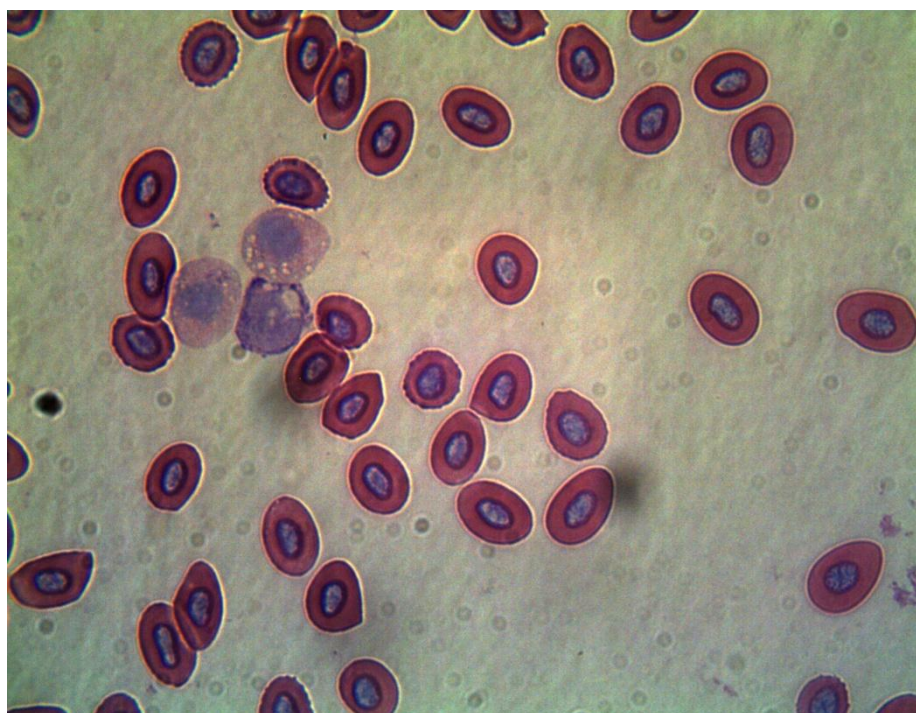


Figura 1. Microfotografía de frotis de sangre de tilapia. Se observan dos neutrófilos y un monocito junto a un gran número de eritrocitos (tinción de Giemsa 1000X).

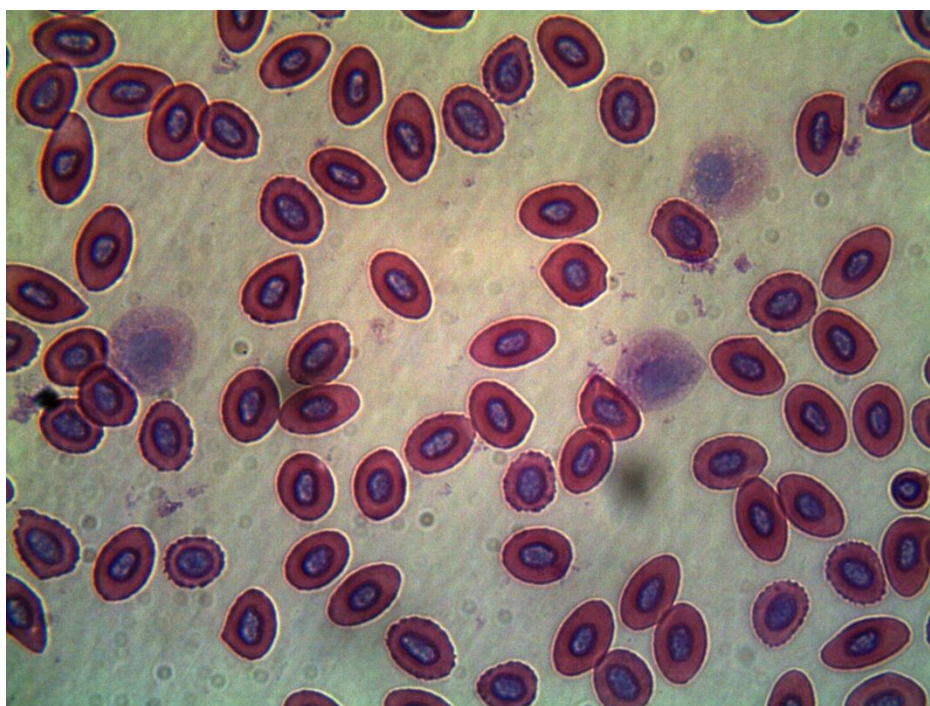


Figura 2. Microfotografía de frotis de sangre en la cual se evidencian tres neutrófilos dispersos entre los eritrocitos (tinción de Giemsa 1000X).

En la Tabla 3 se presentan los principales hallazgos de necropsia observados en las tilapias infectadas

Tabla 3. Frecuencia de observación (en %) de hallazgos de necropsia en tilapias nilóticas (*Oreochromis niloticus*) infectadas experimentalmente con *Aeromonas hydrophila*

Hallazgo de necropsia	Frecuencia de observación (%)
Hígado friable	88,9
Bazo congestivo	88,9
Hepatomegalia	66,7
Hígado congestivo	66,7
Mucosa del tubo digestivo congestiva	66,7
Esplenomegalia	55,6
Mucosa estomacal congestiva	55,6
Gas en tubo digestivo	55,6
Cerebro congestivo	44,4
Contenido serosanguinolento en tubo digestivo	33,3
Branquias congestivas	11,1

En la Figura 3 se puede observar el aspecto que adquieren los órganos de la cavidad abdominal de los peces infectados experimentalmente.



Figura 3: Aspecto de los órganos de la cavidad abdominal de tilapias nilóticas (*Oreochromis niloticus*) infectadas experimentalmente con *Aeromonas hydrophila* por vía intraperitoneal.

6. DISCUSIÓN

6.1. Signos clínicos

Aeromonas hydrophila es uno de los patógenos más comunes e importantes en la producción de peces de agua dulce (Avault, 1995). En este estudio se inoculó en forma experimental a tilapias nilóticas (*Oerochromis niloticus*) por vía intraperitoneal una concentración equivalente a una DL50₉₆ ($9,3 \times 10^8$ ufc.mL⁻¹). A partir de este procedimiento fue posible desarrollar un cuadro clínico y patológico de SAM compatible con los descritos por otros autores en condiciones similares (Janda & Abbot, 2010).

Debemos tener en cuenta que *Aeromonas hydrophila* es componente natural de la microflora normal intestinal de los peces, por lo que su sola presencia no indica enfermedad y consecuentemente con esto existen determinados factores predisponentes para desencadenar el proceso patológico, tales como: cambios abruptos de temperatura, manipulación, superpoblación, inadecuado aporte de oxígeno y alimento (Yardimci y Aydin.,2011).

En nuestro estudio, a partir de las primeras horas posinfección se observaron signos no específicos de SAM, de tipo comportamentales tales como letargia, cambios de coloración y anorexia similar a lo reportado por Camus y col. (1998) y Kanbutra y col. (2014) en animales infectados experimentalmente. Un cuadro clínico similar fue evidenciado a su vez en infecciones naturales por *Aeromonas* móviles en tilapias por Plumb (1997).

Rey y col. (2009) inocularon tilapias de modo experimental tanto con *Aeromonas hydrophila* viva como con PEC de la misma especie hallando síntomas clínicos como letargia, anorexia, boqueo en superficie y aumento de la frecuencia opercular. Cambio de coloración, escaldado y ulceración necrótica en el sitio de inyección fue notificado por Azad y col. (2010).

De acuerdo a lo reportado por Azad (2010) la variabilidad en los signos clínicos estarían relacionados a la producción de endotoxinas, hemolisinas, citoquinas, proteasas y la capacidad de adherencia a células, todos estos factores atribuidos a la potencial patogenicidad de los aeromonadales móviles.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en nuestro estudio se puede apreciar que en las primeras horas posinfección, a pesar de que se observan signos clínicos mayoritariamente comportamentales (letargia y cambio de coloración), existe un proceso patológico sistémico ya instalado que se ve reflejado en las alteraciones del leucograma diferencial ya a las 24hs posinfección.

Con el paso de las horas posinfección aumenta la frecuencia de observación de signos clínicos que evidencian una importante alteración sistémica tales

como aletas congestivas, lo que podría indicar la progresión un proceso hemodinámico sistémico, tal como ha sido descrito por otros autores en tilapias infectadas experimentalmente con *A. hydrophila* (Vázquez y col., 2010).

Otros signos tales como hemorragia periorcular y periopercular, úlceras y lepidortosis han sido notificados por Yardimici y Aydin (2011) en tilapias nilóticas infectadas experimentalmente con *A. hydrophila*.

6.2. Leucograma diferencial

La hematología es una herramienta de diagnóstico que asiste al veterinario en la detección de enfermedades o identificando cambios fisiológicos. Como en otros animales, la variación de los factores intrínsecos y extrínsecos normales o las patologías que afectan las células sanguíneas y su número pueden evaluarse con la hematología clínica. A partir de una pequeña muestra de sangre se puede revelar información útil para la evaluación del estado de salud de los animales o la progresión de los tratamientos instalados (Grant y col., 2015).

En el leucograma diferencial de los peces infectados en este estudio se observó una disminución considerable de linfocitos en relación con lo ocurrido con el grupo control y un aumento notorio de la proporción de neutrófilos y basófilos con relación a la proporción normal de estas células en los animales control, lo que nos indica la instauración de una respuesta inmunológica frente a la infección por *Aeromonas* spp. tal como lo notificó Haniffa y col. (2008) y Silveira-Coffigny (2004) en tilapias infectadas con *Corynebacterium* spp.

Esta alteración en las proporciones de las células está relacionada con la migración de las mismas a los tejidos donde se desarrolla la infección (Lamas y col., 1994).

En nuestra experiencia, en el leucograma diferencial se pudo observar linfocitos, neutrófilos y basófilos circulantes en sangre de tilapias, mientras que no fue posible la observación de eosinófilos, similar a lo reportado por Vázquez y col. (2010) en tilapias infectadas experimentalmente con *A. hydrophila*.

Los linfocitos componen la mayoría de los leucocitos hallados normalmente en la sangre periférica de las tilapias aparentemente sanas. La célula tiene una forma ovoide o redonda. El núcleo es compacto y se tiñe de un color azul oscuro. (coloración de Sato y Sekiya). El citoplasma es ligeramente basófilo pudiendo presentar pseudópodos (Conroy., 2007).

Los neutrófilos tienen una forma ovoide o redonda. El núcleo se tiñe de azul morado mientras que el citoplasma presenta un color azul pálido (gránulos pequeños). No suelen ser observados en gran cantidad en sangre de tilapias

sanas y su función es principalmente fagocítica (ver figura 4). Los basófilos por su parte son células ovoides con núcleo excéntrico y citoplasma con varios gránulos grandes y basófilos de color azul-morado oscuro. Los eosinófilos se caracterizan por presentar citoplasma con gránulos numerosos y fuertemente acidófilos. (Coloración de Sato y Sekiya).(Conroy., 2007).

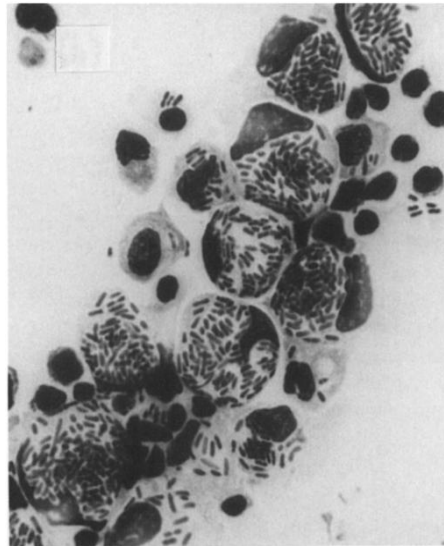


Figura 4. Neutrófilos de tilapia fagocitando células de *Aeromonas hydrophila* (tomado de Ainsworth., 1992)

Del mismo modo que Vázquez y col. (2010), consideramos adecuado advertir que si bien los resultados de nuestro estudio muestran una proporción de leucocitos alterada en los animales infectados con respecto al control, no es posible realizar conclusiones en términos absolutos (linfopenia, neutrofilia y basofilia) debido a que el análisis sanguíneo realizado no contempló el conteo total de leucocitos. Por ende no es posible conocer el número total de cada tipo celular evaluado.

6.3. Hallazgos de necropsia

Los hallazgos de necropsia más representativos de los animales infectados experimentalmente en el marco de ésta investigación (bazo congestivo e hígado friable, aumento de tamaño de los órganos, mucosas congestivas, gas

y contenido serosanguinolento en el tracto gastrointestinal) fueron también notificados por Rey y col. (2009) y Yardimci y Aydin (2011) en tilapias infectadas experimentalmente con *A. hydrophila*. Según estos autores, la hemorragia e infiltración linfocitaria en varios órganos internos revela la existencia de una septicemia hemorrágica visceral.

7. CONCLUSIONES

Es posible reproducir un cuadro clínico y patológico compatible con la Septicemia por aeromonadales móviles en tilapias nilóticas (*Oreochromis niloticus*) a partir de la infección experimental con *Aeromonas hydrophila* por vía intraperitoneal.

Los signos clínicos tales como letargia y cambio de coloración son de temprana aparición en los peces dado que se presentan a partir de las 24 horas posinfección experimental (PI). A partir de las 48 horas PI son evidenciables todos los signos clínicos expresados por los animales infectados, entre los que se destacan por su frecuencia: anorexia y aletas congestivas, replegadas y deshinchadas; además de los mencionados previamente.

Las alteraciones del leucograma diferencial se aprecian a partir de las 24 horas posinfección experimental y se caracterizan por el aumento de neutrófilos y basófilos con disminución de linfocitos circulantes.

Los hallazgos de necropsia más característicos de la infección experimental con *A. hydrophila* en *O. niloticus* por vía intraperitoneal son: bazo e hígados friables y congestivos, congestión y gas en tracto gastrointestinal.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Acha, P. N.; Szyfres, B.(2001) Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. OMS.nro. 580 vol. 1:7-15. Washington.
- 2) Ainsworth. A. Jerald (1992) Fish granulocytes: morphology, distribution and function. p.: 16-19., Mississippi.
- 3) Amin, N.; Abdallah I.S.; Elallawy, T.; Ahmed, S.M.(1985) Motile *Aeromonas septicaemia* among *Tilapia Nilotica* (*Satherodon niloticus*) in Upper Egypt.p.:1-5. Egypt.
- 4) Aoki, A.(1998) Motile *Aeromonas* (*Aeromonas hydrophila*). *Fish Diseases and Disorders. Viral Bacterial and Fungal Infections, V.3*, p.:427-454. Wallingford, USA.
- 5) Austin, B.; Austin, D. (1999) *Bacterial Fish Pathogens* 5^a ed, Edinburgh, Springer-Praxis, p.: 119-147. Scotland.
- 6) Avault, J. (1995) Understanding bacteria and bacterial diseases in aquaculture. *Aquac. Magazine*. Nov-Dic.p.:68-76. USA.
- 7) Azad I.S., Rajendran K.V., Rajan J.J.S., Vijayan K.K., Santiago T.C. (2010)Virulence and histopathology of *Aeromonas hydrophila* (SH93) in experimentally infected *Tilapia* (*Oreochromis mossambicus*).p.:6-10.India.
- 8) Bartram J., Cotruvo J, Exner M, Fricker C, Glasmacher A. (2003) *Heterotrophic plate counts and drinking-water safety: the significance of HPCs for water quality and human health*. Serie de la OMS *Emerging Issues in Water and Infectious Disease*. IWA Publishing , Londres.
- 9) Benli K. & Yildiz H. (2004) Blood parameters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) spontaneously infected with *Edwardsiella tarda*..Blackwell Publishing, Ankara, Turquía.
- 10)Camus, A.C., Durborow, R.M., Hemstreet, W.G., Thune, R.L., Hawke, J.P. (1998) *Aeromonas* Bacterial Infections Motile *Aeromonas* Septicemia. Southern Regional Aquaculture Center. SARC Publication No. 478. 4 p., USA.
- 11)Carnevia, D.; Letamendía, M.; Perretta, A.; Delgado, E. (2010) Caracterización de septicemia hemorrágica bacteriana (SHB), diagnosticadas en peces ornamentales del Uruguay.; 46 (177):27-32, Montevideo.
- 12)Chacón M, Figueras G, Castro G, Soler L, Guarro J.(2003) Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. ; 84: 269-278.Spain-Mexico.
- 13)Chacon M., Figueras G, Castro G, Soler L, Guarro J , Fernández-Rendón E. , Aparicio G.O. (2003) Characterization of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *International Journal of Food Microbiology* 84.41-49.Mexico.
- 14)Chopra, A. K. & Houston, C. W. (1999) Enterotoxins in *Aeromonas* associated gastroenteritis. *Microbes and Infection* 1: 1129-1137. Galveston, Texas, USA.

- 15) Cipriano, R., Bullock G.L., Pyle S.W. (2001) *Aeromonas hydrophila* and Motile Aeromonas Septicemias of fish. Lincoln, Nebraska, USA.
- 16) Conroy, G. & Conroy D., (2007) Tilapia Cells Atlas, p.:19-28. Published by Patterson Peddie Consulting Ltd., Northern Ireland, UK.
- 17) Constantino, F., Armijo, A., Osorio, D., Chávez, L. (1997) Infección por *Aeromonas hydrophila* e *ichthyophthirius multifiliis* en trucha (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) y Tilapia (*Oreochromis aureus*, L); Morelos, México; Vet. Mex, 28(1): 59-62.
- 18) FAO. (2006) State of world aquaculture. Production: environments, species, quantities and values. Fishery and Aquaculture Department. Corporate Document Repository. Fisher Technical paper N°500. Roma. 16 p.
- 19) Farmer, J.J., Arduino, M.J., Hickman-Brenner, F.W. (2006) The genera *Aeromonas* y *Plesiomonas*. Chapter 3.3.19. Prokaryotes, 6:654-596. Published by Springer New York, USA.
- 20) Fuentes Rodriguez, J.M., Perez Hernandez, J.A. (1997) Aislamiento de *Aeromonas hydrophila* en trucha Arcoiris. Publicado por Revista Vet. Mex. Centro acuícola El Zarco, Ocoyoacac, Mexico.
- 21) Godoy Rosado, Eduardo (2015) Manual de crianza de Tilapia, Alicorp SA, Carmen de la Legua, Perú.
- 22) González, M., Torres, T., Chiroles, S., Valdés, M., Domínguez, I. (2004) *Aeromonas spp.*: patógenos emergentes a considerar en aguas; Revista electrónica de la Agencia de Medio Ambiente, No. 6. Disponible en: <http://ama.redciencia.cu/articulos/6.05.pdf>.
Fecha de consulta: junio, 2016.; Cuba.
- 23) Grant, K., (2015) Fish Hematology and Associated Disorders. p.: 8-10, Fort Collins, Colorado, USA, 2015.
- 24) Grizzle, J. M. & Kiryu, Y. (1993) Histopathology of gill, liver, pancreas and serum enzyme levels of Channel catfish infected with *Aeromonas hydrophila* complex. *Journal of Aquatic Animal Health* 5: 36-50.
- 25) Hanniffa, M., Dhanaraj, M., Muthu, R. C., Arockiaraj, A. J., Raman, S. S. (2008) Haematological Analysis of Common Carp (*Cyprinus carpio*), Gold Fish (*Carassius auratus*), Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and Stinging Catfish (*Heteropneustes fossilis*) spontaneously infected with *Aeromonas hydrophila* Malaysian Journal of Science 27 (1): 61– 67.
- 26) Hazen, T.C. Raker, M. L... Esch, G. W., Fliermans, C. B. (1978) Ultraestructure of red-sore lesions on largemouth bass (*Micropterus salmoides*): Asociation of the ciliate *Epistylis sp.* and the bacterium *Aeromonas hydrophila*. *Protozool* 25:351-355. Wake Forest University, USA.
- 27) Hrubec, T., Cardinale, J., Smith, S. (2000) Hematology and Plasma Chemistry Reference Intervals for Cultured Tilapia.: 4-6, Virginia, USA.
- 28) Huizinga, H., Esch, G. & Hazen, T. (1979) Histopathology of red-sore disease (*Aeromonas hydrophila*) in naturally and experimentally infected largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacépède). *J Fish Dis*, 2:263-277. USA.

- 29) Ibrahem, M., Mostafa, M., Arab, M. & Rezk, M. (2008) Prevalence of *Aeromonas hydrophila* infection in wild and cultured Tilapia Nilotica (*O. niloticus*) in Egypt. 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture. Egypt, : 1265-1267.
- 30) Inglis V, Roberts R, Bromage N. (1993) Bacterial diseases of fish. Published by Wiley-Blackwell Science 303, UK.
- 31) Janda, J.M.; Abbott, S.L. & Cheung, W. (2003) The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions and phenotypic identification schemes. *Journal of Microbiology* 41:6. USA.
- 32) Kanbutra, P., Borisutpeth, P., Chukanhom, K., Weerakhun, S. & Chaimanee, P. (2014) Pathogenesis in experimental infected Nile Tilapia (*O. niloticus*) of *A. hydrophila* isolated from diseased fish.:3-5. Thailand.
- 33) Kaper, J.B., Lochman, H., Colwell, R.R., Joseph, S.W. (1981) *Aeromonas hydrophila*: Ecology and toxigenicity of isolates from an estuary. *J Appl Bacteriol.* , 50: 359-377.
- 34) Khalil, A.H., Mansour, E.H. (1997) Toxicity of Crude Extracellular Products of *Aeromonas hydrophila* in Tilapia, *Tilapia nilótica*. *Lett Appl Microbiology*: 25:269-273. Egypt.
- 35) Lamas, J., Santos, Y., Bruno, D., Toranzo, D. & Anadón, R. (1994) Non-specific cellular responses of rainbow trout to *Vibrio anguillarum* and its extracellular products (ECPs). *J. Fish. Biol.* 45 (5): 839-854. Published by The Fisheries Society of British Isles.
- 36) Martin-Carnahan A. , Joseph S.W. (2005) Genus 1 *Aeromonas* Stanier 1943, 213AL. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Published by New York Springer. USA.
- 37) Noga, E. (2011) Fish diseases: diagnosis and treatment. Part II, chapter 10, page 46, USA.
- 38) Paniagua, C., Rivero, O., Anguita, J. & Naharro, G. (1990) Pathogenicity Factors and Virulence for Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) of Motile *Aeromonas* spp. Isolated from a River. *Journal of Clinical Microbiology* 28:350-355.
- 39) Plumb J. (1997) Infectious disease of tilapia en: Costa-Pierce A, Rakocy E. *Tilapia Aquaculture in the Americas*. Auburn, ed. B.A. World Aquaculture Society. VI, p 212-228. Louisiana, USA.
- 40) Harikrishnan, R. & Balasundaram, C. (2005) Modern trends in *Aeromonas hydrophila* disease management with fish: 3-7;16-17. Bharathidasan University, Tamilnadu, India.
- 41) Silveira-Coffigny, R., Prieto-Trujillo, A., Asencio-Valle, F. (2004) Effects of different stressors in haematological variables in cultured *Oreochromis aureus* S. Cuba.
- 42) Rey, A., Verján, N., Ferguson, H.W., Iregui, C. (2009) Pathogenesis of *Aeromonas hydrophila* strain KJ99 infection and its extracellular products in two species of fish. *Veterinary Record* 164:493-499.

- 43) Roberts, R. & Sommersville, C. (1982) Diseases of Tilapias. The biology and culture of tilapias, ICLARM Conference proceedings. :243-267. Manila, Philippines.
- 44) Rodríguez L., Ellis A., Nieto T. (1991) Purification and characterization of an extracellular metalloprotease, serine protease and haemolysin of *Aeromonas hydrophila* strain B32: all are lethal for fish. Spain.
- 45) Rodríguez M., Botero E., Iregui C., Figueroa J. (2005) Extracción de productos extracelulares de *Aeromonas hydrophila* y sus efectos en Tilapia roja (*Oreochromis spp.*) y Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). ; Acta Biológica Colombiana, V. 10(2):75, Colombia.
- 46) Saavedra, M.; Guedes-Novais, S. (2004) Resistance to β -lactam antibiotics in *Aeromonas hydrophila* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*); International Microbiology 7:207–211. Portugal.
- 47) Sebastião, F., Nomura, D., Sakabe, R., Pilarski, F. (2011) Hematology and productive performance of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) naturally infected with *Flavobacterium columnare*. Brazil.
- 48) Stanier (1943) Bergey Manual of Systematic Bacteriology en: *Aeromonas*, Martin-Carnahan, A., Joseph, S. 2ª ed. New York, Springer Publishing, v. 2, p B, p. 557-578.
- 49) Stoskopf, M. K. (1993) Fish medicine. p. 269-277. Published by W.S. Saunders Company, Philadelphia, USA.
- 50) Strom, Mark. (1997) Enciclopedia de la Ciencia, Tomo 1. Northwest Fisheries Science Center. The Prokaryotes, v.6, c.3.3.19.p.564-596. USA.
- 51) Thune R.L., Johnson M.C., Graham T.E., Amborski R.L. (1986) *Aeromonas hydrophila* β -Haemolysin: Purification and Examination of Its Role in Virulence in 0-Group Channel Catfish, *Ictalurus Punctatus*. Fish Diseases.9:55-61.
- 52) Vásquez, M. A; Rondón I.S.; Restrepo, L. F.; Eslava, P. R. (2010) Estudio clínico y hematológico de una infección experimental con *Aeromonas hydrophila* y *Edwardsiella tarda* en tilapia, *Oreochromis spp.* Orinoquia 14 (1):33-44, Colombia.
- 53) Wakefield, R. (2014) Tilapia: Biology, Management Practices and Human Consumption (Fish, Fishing and Fisheries). Published by Nova Publishers, New York, USA.
- 54) Yardimci, B. & Aydin, Y. (2011) Pathological findings of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).p:47-53. Ankara, Turkey.