

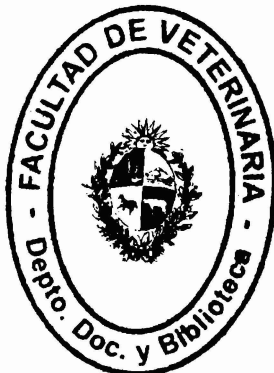
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

EVALUACIÓN DE UNA VACUNA EN BASE A BACTERINA DE *Aeromonas hydrophila* (BACTERIA: AEROMONADACEAE) EN *Carassius auratus* (PISCES: CIPRINIDAE)

por

RODRÍGUEZ CANALE María Carolina



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

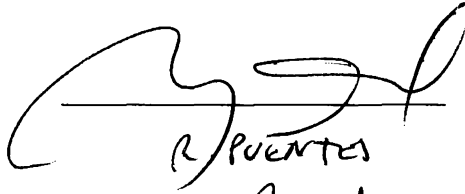
**MONTEVIDEO
URUGUAY
2012**



FV-29430

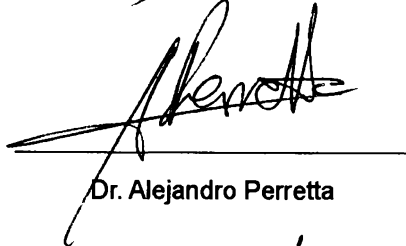
Página de Aprobación

Presidente de mesa:



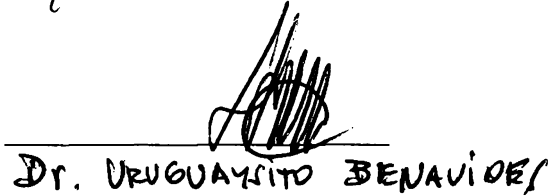
R. Puentes

Segundo miembro (tutor):



Dr. Alejandro Perretta

Tercer miembro:



Dr. URUGUAYSITO BENAÏDES

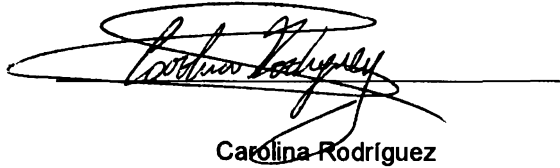
Cuarto miembro (cotutor):



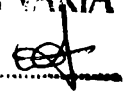
Dr. Daniel Carnevia

Fecha: 23/03/2012

Autora:



Carolina Rodríguez

FACULTAD DE VETERINARIA
Aprobado por: 12 (doce) 

Dedicatoria

Para mis padres

Agradecimientos

Daniel Carnevia

Alejandro Perretta

Acuicultura Punta Negra

Personal docente y no docente del IIP

Adriana López Quintana

Lista de Figuras

	Página
Figura 1. Alojamiento de los peces.....	26
Figura 2. Placa de aglutinación.....	28
Figura 3. Concentración del inculo bacteriano vs. mortalidad acumulada para el cálculo de la DL ₅₀	30
Figura 4. Ejemplar de <i>Carassius auratus</i> con ascitis.....	31
Figura 5. <i>Carassius auratus</i> presentando lesiones ulcerosas a nivel abdominal.....	31
Figura 6. Colonias de <i>A. hydrophila</i> en medio TSA.....	31
Figura 7. Dilución máxima de sueros de <i>Carassius auratus</i> (vacunados y control) en la que se observó aglutinación positiva a <i>Aeromonas hydrophila</i>	32

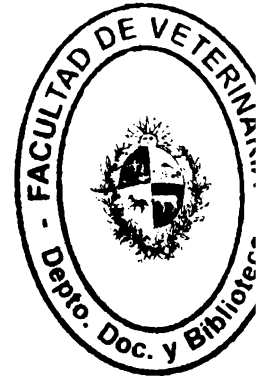
Lista de Tablas

Tabla 1.	Características bioquímicas de especies de <i>Aeromonas</i>	17
Tabla 2.	Mortalidad de <i>Carassius Auratus</i> inoculados con diferentes concentraciones de <i>A. hydrophila</i>	29

TABLA DE CONTENIDO

	Página
Página de Aprobación.....	1
Dedicatoria.....	2
Agradecimientos.....	3
Lista de Figuras.....	4
Lista de Tablas.....	5
1. Resumen.....	8
2. Summary.....	9
3. Introducción.....	10
3.1. <i>Carassius auratus</i>	11
3.2. Características del género <i>Aeromonas</i>	12
3.2.1. <i>Aeromonas</i> como causal de enfermedades en los peces....	13
3.2.2. Patogenicidad de <i>Aeromonas</i> móviles.....	14
3.2.3. Historia de <i>A. hydrophila</i>	15
3.2.4. Características de <i>A. hydrophila</i>	16
3.2.5. Enfermedades causadas por <i>A. hydrophila</i> en peces.....	17
3.3. Sistema inmune en peces.....	18
3.3.1. Sistema inmune innato.....	18
3.3.2. Sistema inmune específico: Inmunoglobulinas.....	19
3.3.3. Producción de anticuerpos en peces.....	20
3.3.4. Memoria inmunológica.....	21
3.4. Vacunación en peces.....	21
3.4.1. Vías de administración de las vacunas.....	22
4. Hipótesis.....	24
5. Objetivos.....	25
5.1. Objetivos generales.....	25
5.2. Objetivos particulares.....	25
6. Materiales y Métodos.....	26
6.1. Sujetos de experimentación.....	26
6.2. Alojamiento de los animales.....	26
6.3. Origen de las bacterias empleadas.....	26
6.4. Determinación de DL ₅₀	27
6.5. Confección de la vacuna e inmunización de los animales...	27
6.6. Evaluación de la protección conferida por la vacunación....	27
6.6.1. Titulación de anticuerpos.....	27
6.6.2. Sobrevivencia a la infección experimental.....	28
6.7. Sacrificio de peces.....	28
6.8. Análisis estadístico de los datos.....	28
7. Resultados.....	29
7.1. Determinación de la DL ₅₀	29
7.2. Signos clínicos.....	30
7.3. Titulación de anticuerpos.....	31
7.4. Sobrevivencia a la infección experimental.....	32

8.	Discusión.....	33
9.	Conclusiones.....	35
10.	Referencias Bibliográficas.....	36



1. RESUMEN

La cría de peces ornamentales es antigua, y en los últimos años se ha dado un aumento en la demanda por parte de los acuaristas de países desarrollados. En nuestro país el cultivo de peces ornamentales se lleva a cabo por aficionados y por productores a escala artesanal, abarcando varias especies, destacándose entre ellas el *goldfish* o pez dorado (*Carassius auratus*) por ser el que representa el mayor volumen de comercialización. A partir del crecimiento de la piscicultura intensiva se ha observado un aumento en la incidencia de enfermedades en los sistemas de producción de peces, causando importantes mortandades y pérdidas económicas significativas. Entre los agentes etiológicos involucrados se destacan las bacterias del género *Aeromonas*, consideradas como los principales patógenos causantes de pérdidas para la piscicultura. Dentro de este género se encuentra *Aeromonas hydrophila*, bacteria gram negativa, móvil, de distribución cosmopolita, copatogeno en infecciones secundarias de peces inmunodeprimidos y con demostrada implicancia en la Septicemia Hemorrágica Bacteriana de los peces. Con el fin lograr inmunidad mediante el empleo de una vacuna en base a bacterina de *Aeromonas hydrophila* en *Carassius auratus* se llevó a cabo este ensayo. En primera instancia se determinó la DL_{50} para *A. hydrophila* en *Carassius auratus*, en la cual los peces fueron inoculados vía intraperitoneal con diferentes concentraciones bacterianas, a partir de 0.5 *Mc Farlan* (1.5×10^8 ufc.mL⁻¹). Con los datos obtenidos se realizó una curva de mortalidad vs concentración bacteriana con la cual se calculó el percentil 50 mediante análisis de regresión con un resultado de 0,858, equivalente a efectos prácticos de 1 en la escala *Mc Farland*. Se registraron además signos clínicos y mortalidad durante los 15 días post infección. Para la confección de la vacuna se utilizó una cepa local de *A. hydrophila* inactivada con formalina con una concentración de células equivalente a 5 en la escala *Mc Farland* (15×10^8 ufc.mL⁻¹), la cual fue aplicada a los peces vía intraperitoneal, evaluándose posteriormente el nivel de anticuerpos generados a los 7, 15 y 30 días pos vacunación, mediante el empleo de la técnica de aglutinación en placa. El nivel de anticuerpos contra *A. hydrophila* en los peces vacunados fue significativamente superior que en los no vacunados (Estadístico Kolmogorov-Smirnov 1,4142 con $p=0,0366$). Por último se comparó la tasa de sobrevivencia al desafío intraperitoneal con *A. hydrophila* entre *C. auratus* inmunizados y no inmunizados a los 7 días pos vacunación, resultando en un 76% en el lote vacunado frente a un 0% en el lote control. Estos resultados preliminares permiten demostrar la efectividad de la inmunización con esta bacterina en carassius, hecho de gran importancia para nuestros acuicultores. En futuros trabajos se deberían investigar otras vías de administración de la vacuna, más prácticas para los acuicultores.

2. SUMMARY

The breeding of ornamental fish is old, and in recent years have seen an increase in demand from developed countries aquarists. In our country the ornamental fish culture is carried out by amateurs and craft-scale producers, comprising several species, prominent among them the goldfish or carassius (*Carassius auratus*) as the which is the largest trading volume. Since the growth of intensive fish farming has been an increase in the incidence of diseases in fish production systems, causing significant mortalities and economic losses. Among the etiologic agents involved highlights the bacteria of the genus *Aeromonas*, considered as the main pathogens causing losses to the fish. Within this genus is *Aeromonas hydrophila*, gram negative, mobile, cosmopolitan distribution, copathogen in secondary infections of immunocompromised fish and proven implication on Bacterial Hemorrhagic Septicemia of fish. In order to achieve immunity by employing of a vaccine based on *Aeromonas hydrophila* bacterin in *Carassius auratus* was carried out this assay. At first we determined the LD₅₀ for *A. hydrophila* in *Carassius auratus*, in which the fish were inoculated intraperitoneally with different bacterial concentrations, from 0.5 Mc Farlan (1.5×10^8 ufc.mL⁻¹). With the data obtained was performed a mortality vs. bacterial concentration curve in which the 50th percentile was calculated by regression analysis with a score of 0.858, equivalent to practical purposes, to 1 on Mc Farland's scale. There were also registered clinical signs and mortality within 15 days post infection. For the preparation of the vaccine we use a local strain of *A. hydrophila* formalin-inactivated cells with a concentration equal to 5 in Mc Farland's scale (15×10^8 ufc.mL⁻¹), which was applied to the fish intraperitoneally. Subsequently we evaluate the level of antibodies generated at 7, 15 and 30 days post vaccination, by employing the technique of plate agglutination. The level of antibodies to *A. hydrophila* in vaccinated fishes was significantly higher than in the unvaccinated ones (Kolmogorov-Smirnov Statistic 1.4142 with $p = 0.0366$). Finally we compared the survival rate in experimental infected *C. Auratus* with *A. hydrophila* between immunized and not immunized groups at 7 days post vaccination, resulting in 76% of survival in the vaccinated group vs. 0 in the control one. These preliminary results demonstrate the effectiveness of the immunization with an *A. hydrophila* bacterin in goldfish, that is very important to our farmers. Future studies should investigate other routes of administration of the vaccine, more practical for farmers.

3. INTRODUCCIÓN

La cría de peces con fines estéticos es antigua. Podemos encontrar ejemplos en las culturas egipcias, romana y especialmente en la oriental. Los llamados acuarios (tanques de vidrio que posibilitan la contemplación de los peces) surgen en el siglo XV en Inglaterra, siendo considerados objetos de lujo para la alta sociedad. Al inicio, las técnicas de manutención eran precarias y los conocimientos sobre las necesidades de los organismos mantenidos eran prácticamente inexistentes. Con la evolución del conocimiento y de la tecnología, la cría de organismos acuáticos se volvió cada vez más segura y de fácil acceso a la población. Debido al aumento de la demanda de peces, principalmente por parte de los acuaristas de países desarrollados, surge la piscicultura de peces ornamentales, modalidad de acuicultura que tuvo un gran crecimiento en la década de los noventa. En nuestro país el cultivo de peces ornamentales, se lleva a cabo por aficionados y por productores a escala artesanal desde la década de los 50, abarcando varias especies (Carnevia, 2008). La familia Cyprinidae incluye a los peces ornamentales que más se comercializan a nivel mundial, abarcando cerca de 2000 especies que involucran aproximadamente unos 210 géneros, existiendo representantes originarios de África, Asia, Europa y América (Panné y Luchini, 2008). Dentro de esta familia se destaca el *goldfish*, pez dorado, carpín o carasius (*Carassius auratus*) por ser el que representa el mayor volumen de comercialización.

En nuestro país el cultivo de peces ornamentales tiene buenas condiciones naturales y existen conocimientos suficientes para llevarlo a cabo. En Uruguay se comercializan cerca de 500.000 peces al año, de los cuales 350.000 son criados en el país (Carnevia y col., 2010). La cría de peces ornamentales constituye una opción interesante debido al elevado precio de venta. En el caso de *Carassius auratus*, especie para la que existe tecnología de producción desarrollada, resta solo considerar los canales de comercialización hasta mercados regionales e internacionales (Carnevia, 2008).

En este sentido, se puede definir un mercado regional, conformado fundamentalmente por Brasil y en menor medida Argentina, que puede captar tanto peces exóticos de clima templado como exóticos tropicales. A su vez existe un mercado internacional integrado por Estados Unidos, Europa y Japón, los cuales captarían fundamentalmente peces autóctonos (Carnevia, 2008).

El mantener altas densidades de peces en áreas limitadas, favorece el surgimiento y la propagación de enfermedades, causando importantes mortandades y pérdidas económicas significativas. Factores ambientales y fisiológicos asociados a estrés contribuyen a la presentación de brotes de las enfermedades y en consecuencia grandes pérdidas económicas para el productor (Costa, 2003; Negrete y col., 2004; Vásquez-Piñeiro y col., 2010). Las enfermedades de los peces son un factor limitante importante en el

desarrollo de sistemas de acuicultura, siendo seguramente las bacterias patógenas el grupo de agentes etiológicos más importantes en la acuicultura moderna (Costa, 2003). Generalmente esto ocurre debido a que todos los tipos de peces son susceptibles a infecciones bacterianas y no es posible evitar su propagación, una vez que estos microorganismos se encuentran naturalmente en el ambiente acuático (Costa, 2003). Una de las bacterias más comúnmente involucradas en fenómenos de mortalidad de peces ornamentales es *Aeromonas hydrophila*. Es importante la investigación de métodos alternativos a los tratamientos con antibióticos para las infecciones de *A. hydrophila* en la cría intensiva (Li y col., 2006), debido a que los antibióticos han demostrado ser efectivos, pero, a largo plazo, podrían generar resistencia y dañar el medio ambiente (Plant y La Patra, 2011; Harikrishnan y col., 2009; Li, y col.2006). El uso indiscriminado de antibióticos en los peces ha aumentado la presencia de plásmidos resistentes en diferentes especies de bacterias patógenas para peces y humanos, implicando un problema para la salud pública (Negrete y col., 2004). En China se han usado mezclas de hierbas medicinales para activar los mecanismos no específicos de defensa y para elevar la respuesta inmune específica de los peces. Ejemplos de estas hierbas: *Rheum officinale*, *Andrographis paniculata*, *Isatis indigotica* y *Lonciera japonica* (Yin y col. 2009). Actúan como inmunoestimulantes que incrementan la resistencia a las infecciones, por medio de la mejora de los mecanismos de defensa (Harikrishnan y col., 2009).

El control de las patologías bacterianas, virales y parasitarias en la acuicultura, utilizando medios de prevención, incluida la vacunación está recomendada por FAO, OIE y por la Unión Europea (Rocha y Coll, 2000).

3.1. *Carassius auratus*

Estos peces se cultivan con finalidad ornamental desde hace más de 1000 años en China. Soportan temperaturas de 0 a 35°C, siendo el óptimo de crecimiento de 20 a 28°C. Son considerados muy resistentes. Prefieren concentraciones de oxígeno superiores a las 4 ppm y pH entre 6.5 y 7. Son omnívoros, alimentándose de fitoplancton, zooplancton (fundamentalmente cladóceros), zoobentos (larvas de insectos), pequeños caracoles, vegetales acuáticos y detritos, además aceptan raciones balanceadas. En lo que respecta a la producción de semillas se utilizan reproductores de uno o dos años de edad, los cuales son mantenidos separados por sexo durante el invierno. Cuando llega la primavera, con temperaturas del entorno de los 15 a 25°C, son colocados en estanque para el desove con *kakabans* (confeccionados con plantas acuáticas o de plástico) para que se adhieran los huevos. Por desove se estima que cada hembra produce entre 500 y 2000 huevos. Luego del desove, que ocurre en 1 a 3 días, se retiran los *kakabans* y se ponen en tanques de nacimiento y larvicultura, unos 10.000 huevos cada 7000 litros de

agua. La incubación dura entre 3 a 7 días a temperatura de 20°C. Cuando los alevines comienzan a comer son alimentados con alimento vivo (infusorios y cladóceros o nauplios de artemia) y ración en polvo de 40% de proteína bruta. Luego de 20 días se pueden retirar y pasar a estanques fertilizados, con abundante zooplancton. Para su crecimiento posterior se utilizan estanques de tierra de 0.2 a 1 hectárea encalados y abonados para fomentar abundante alimento natural. Se siembra a razón de 100 peces.m⁻² y se alimentan con raciones balanceadas a 2-3% de la biomasa por día. El índice de conversión es de 2 a 3.3. A los 60 días se vacían los estanques y se clasifican y resiembran con 50-70 peces por metro cuadrado. La sobrevivencia que se logra en esta etapa es del 80%, siendo criados por otros 60 días más. El tamaño comercial de los carasius va desde los 4cm (7g) hasta 8cm (30g) de longitud total, variando el precio de venta según la variedad y el tamaño. La producción que se obtiene varía según el sistema utilizado (40kg.m⁻² a 1000-4000 kg.ha⁻¹) (Carnevia, 2008).

A partir del crecimiento de la piscicultura intensiva se ha observado un aumento en la incidencia de enfermedades en los sistemas de producción de peces. Muchos de los agentes etiológicos involucrados en estos problemas no han sido identificados todavía, y los procesos que causan han sido poco estudiados. Dentro de estos agentes se destacan las bacterias del género *Aeromonas*, consideradas como los principales patógenos causantes de pérdidas para la piscicultura (Costa, 2003).

3.2. Características del género *Aeromonas*

Las bacterias pertenecientes al género *Aeromonas* se caracterizan por ser bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, no esporulados, mayoritariamente móviles debido a la presencia de un flagelo polar. Se encuentran presentes naturalmente en ecosistemas acuáticos y forman parte de la flora microbiana normal de organismos que allí habitan. Inicialmente *Aeromonas* sp. fue reconocida solamente como causante de daño sistémico en animales ectotermos. Hoy las bacterias pertenecientes a este género son consideradas no solo como patógenos importantes de los peces y otros ectotermos, sino también como agentes etiológicos responsables de una variedad de complicaciones infecciosas tanto en personas inmunocomprometidas como en inmunocompetentes. A su vez se las ha asociado con enfermedades en animales domésticos como ser: ovejas, perros y gatos, especialmente cuando son expuestos a periodos de stress. *Aeromonas* también han sido encontradas en variedad de productos alimentarios produciendo toxinas, como la hemolisina, enterotoxina y citotoxinas (Janda y Abbott, 2010; Poobalane, 2007; Aoki, 1999).

En 1980 se hallaban descritas solo cuatro de las especies de *Aeromonas* afectando peces, a saber: *A. hydrophila*, *A. punctata*, *A. salmonicida* y *A. sobria*, hoy en día la cifra asciende a veinticuatro, con la reciente propuesta de *A. tecta* (Janda y Abbott, 2010).

Desde la creación del género en 1943, *Aeromonas* se ha separado en dos grupos, basados en las características de crecimiento y en rasgos bioquímicos. El grupo de mesófilos, tipificado por *A. hydrophila*, consiste en bacterias móviles que crecen bien a 35-37°C y están asociadas con una variedad de infecciones humanas además de afectar peces y anfibios. Otros representantes de este grupo son: *A. caviae*, *A. veronii* y *A. sobria*, cuyas características bioquímicas se encuentran en la Tabla 1. El segundo grupo, referido a las cepas psicrófilas, bacterias no móviles causantes de enfermedades en peces, con una temperatura de crecimiento de 22 a 25°C (Janda y Abbott, 2010; Poobalane, 2007). En este grupo se encuentra *A. salmonicida*, patógeno de gran importancia para la acuicultura (Janda y Abbott, 2010; Poobalane, 2007).

Aeromonas es un género que ha mostrado ser antigénicamente muy diverso con más de noventa serogrupos catalogados hasta el momento (Poobalane, 2007).

3.2.1. *Aeromonas* como causal de enfermedad en los peces.

El rol de *Aeromonas spp.* como causantes de enfermedad en los peces es bien conocido desde hace décadas, mucho más que como causante de enfermedad en los humanos. Entre ellas se destacan la *A. salmonicida sensu stricto*, agente etiológico de forunculosis, patología muy importante en salmonicultura (Janda y Abbott, 2010). Particularmente afecta a peces de agua fría, como la trucha marrón (*Salmo trutta*), trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), aunque puede ser hallada también en otros peces, tales como: ayú (*Plecoglossus altivelis*), carpa común (*Cyprinus carpio*), bagre africano (*Clarias batrachus*), anguila japonesa (*Anguilla japonica*), anguila americana (*Anguilla rostrata*), goldfish (*Carassius auratus*) y tilapia (*Oreochromis niloticus*) entre otros (Aoki, 1999).

Dentro del grupo de *Aeromonas* mesófilas se encuentran *A. hydrophila* y *A. veronii*, que afectan a la carpa, tilapia, perca y bagre, entre otros. De estas, *A. hydrophila* es la más notable, ya que se la ha vinculado como causante de grandes pérdidas económicas debido a mortalidades masivas en piscicultura (Janda y Abbott, 2010). En China ha sido considerada como el agente etiológico dominante dentro de las *Aeromonas* móviles que causan enfermedad (Austin y Austin, 2007). En el año 2002 en Indonesia, se constataron pérdidas de *Carassius auratus* de 820 toneladas, resultando en pérdidas económicas de 37.5 millones de dólares. La mayoría de las veces las especies de *Aeromonas* actúan como copatogenos causando infección secundaria en peces inmunosuprimidos (Janda y Abbott, 2010). Estos microorganismos pueden

causar enfermedades en animales ecto y endotermos, incluido el hombre, y están asociados a la Septicemia Hemorrágica Bacteriana en peces de agua dulce (Carnevia y col., 2003; Costa, 2003 y Cipriano, 2001). Las bacterias que causan esta patología son consideradas oportunistas, formando parte de la flora intestinal de los peces y de otros animales acuáticos, por lo tanto su presencia no es indicativa de enfermedad (Cipriano 2001, Vásquez-Piñeros, y col., 2010).

Las especies de bacterias clasificadas dentro del género *Aeromonas* y que causan problemas en peces de agua dulce son: *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae* y *A. salmonicida*, siendo esta última la única especie del complejo *Aeromonas* que no es móvil y que es un patógeno obligatorio de peces (Costa, 2003).

3.2.2. Patogenicidad de *Aeromonas* móviles.

Las bacterias del complejo *Aeromonas* viven libremente en agua dulce asociadas a fondos ricos en materia orgánica, siendo parte, además de la flora normal del tubo digestivo de peces de agua dulce (Carnevia y col., 2003; Fuentes y Pérez, 1998). *Aeromonas* móviles causan diversas patologías en peces que incluyen infecciones agudas, crónicas y subclínicas. La severidad de las enfermedades está influida por varios factores interrelacionados, incluyendo, virulencia bacteriana, el grado de estrés en la población de peces, la condición fisiológica del huésped, y el grado de resistencia genética inherente. *Aeromonas* móviles difieren interespecíficamente e intraespecíficamente en su patogenia relativa o en su capacidad de causar enfermedad. Cuando los signos clínicos de infección están presentes, los peces afectados muestran, exoftalmia, enrojecimiento de la piel, y acumulación de fluido entre las escamas. El abdomen puede verse distendido como resultado del edema y las escamas pueden protruir de la piel. Las branquias pueden estar hemorrágicas y la dermis ulcerada. La infección sistémica es caracterizada por una necrosis difusa en varios órganos internos y la presencia de macrófagos en sangre. El hígado puede volverse pálido o tener una coloración verdosa mientras que los riñones pueden volverse friables e inflamarse en episodios septicémicos. Estos órganos son aparentemente atacados por las toxinas bacterianas y pierden su integridad estructural (Cipriano, 2001).

Las infecciones crónicas provocadas por *Aeromonas* móviles se manifiestan primariamente en forma de úlceras, con lesiones dérmicas con focos hemorrágicos e inflamación. Tanto la dermis como la epidermis son erosionadas y la musculatura adyacente se vuelve necrótica. Las células inflamatorias usualmente faltan en la musculatura necrótica, mientras que la epidermis adyacente experimenta hiperplasia. En este estadio, la infección se vuelve septicémica, hallándose petequias en músculo y peritoneo. *Aeromonas*



móviles también pueden causar enfermedad en vertebrados endotermos, por ejemplo en humanos inmunocomprometidos puede causar: artritis séptica, diarrea, ulcera de córnea, infecciones de piel, meningitis y septicemias fulminantes (Cipriano, 2001). Se considera que el agua es la principal fuente de infección, causando toxiinfecciones alimentarias. Algunas cepas productoras de enterotoxinas pueden encontrarse aún en alimentos refrigerados (Pin, 1995). La habilidad de *A. hydrophila* de crecer a 5°C puede indicar su potencial riesgo en la salud pública (Cipriano, 2001).

Aeromonas móviles han mostrado tener una gran respuesta quimiotáctica al mucus de la piel de los peces, en particular *A. hydrophila* tiene características de adhesión aglutinativa, la cual le facilita el ataque a las células eucariotas. La microscopía electrónica demostró que el pili le facilita la adhesión. En cepas aisladas de procesos infecciosos, se ha visto la presencia de diferentes enzimas que intervienen en la patogenicidad *A. hydrophila* como ser: la serina proteasa, asociada con la activación de la aerolisina; el colesterol aciltransferasa GCAT, genes codificadores de lipasa como: plc, lipH3, pla, lip y genes de DNasa (Vásquez-Piñeros y col., 2010).

La expresión de varios factores de virulencia y de división celular de esta bacteria, puede estar controlado por *Quorum sensing*, mecanismo de control de expresión génica en respuesta a la expansión de la población bacteriana. En algunas bacterias gram negativas como en el caso de *A. hydrophila*, la molécula señal difusible de *Quorum sensing* es un miembro de la familia N-acilhomoserinlactona. La acumulación de esta molécula sobre una concentración umbral mínima, indica que la población ha alcanzado un tamaño mínimo (Swift y col., 1997).

La proliferación de *A. hydrophila* depende íntimamente de la intercomunicación entre ellas, de la exclusión competitiva así como de la disminución de la inmunocompetencia del hospedero (Vásquez-Piñeros y col., 2010).

3.2.3. Historia de *A. hydrophila*.

Zimmermann fue el primer autor que describió un miembro perteneciente al actual género *Aeromonas*, en el año 1890. Dicha bacteria fue aislada del agua potable de la ciudad de Chemnitz en Alemania, y recibió la denominación de *Bacillus punctatus*. En años posteriores, varios autores describieron cepas similares que procedían de orígenes acuáticos diversos, pasando su denominación de *B. punctatum* a *Achromobacter punctatum*, pasando luego al género *Pseudomonas*, como *Pseudomona punctata*. En la séptima edición del Manual Bergey, este microorganismo, finalmente se registra como *Aeromonas punctata* (Pin, 1995).

Luego de un año de la publicación de Zimmermann, Sanarelli aisló un bacilo de la sangre y de la linfa de una rana, designándola como *Bacillus hydrophilafucus*. Sanarelli teniendo en cuenta los estudios realizados por Ernst

en 1890, acerca del *Bacillus ranicida* (agente causal de la enfermedad primaveral de las ranas), concluye que ambas especies debían ser las mismas. Además descarta el término ranicida, ya que el microorganismo afectaba peces y animales de sangre caliente. En el Manual Bergey es denominada esta especie como *Proteus hydrophilus*, conservándolo hasta su transferencia al género *Pseudomonas*. En la séptima edición del Manual Bergey se reclasificó como *Aeromonas hydrophila* (Pin, 1995).

3.2.4. Características de *A. hydrophila*.

Aeromonas hydrophila es un bacilo fermentador con un tamaño aproximado de 0.8 a 1.0 x 1.0 a 3.5 μm . Posee motilidad, dada por la presencia de un flagelo polar y es capaz de producir dos tipos distintos de flagelos: uno polar, para nadar en líquidos y flagelos laterales para aglomerarse sobre superficies (Poobalane, 2007). No tiene estado de espora y carece de cápsula (Aoki, 1999). Es una bacteria gram negativa que infecta un amplio rango de hospedadores incluyendo; anfibios, reptiles, aves y mamíferos (Fang y col., 1998).

Esta bacteria puede aislarse en medios no selectivos como ser el TSA (tripticosa soya agar). Las colonias que crecen en este medio tienen apariencia redonda, de color amarillento, elevadas y de 2 a 3 mm de diámetro. El ambiente de cultivo juega un rol importante en el crecimiento y virulencia de la bacteria, sobre todo la disponibilidad de nutrientes, temperatura y pH. Algunas investigaciones detectaron que el efecto de la temperatura y la actividad de agua (aw), son muy importantes en el crecimiento de la bacteria, y con respecto al pH se vio un mayor crecimiento de la fase logarítmica a pH 6. Si bien *A. hydrophila* puede crecer en un amplio rango de temperatura (25 a 35°C), se sugiere como temperatura óptima 20°C. Es sensible a los siguientes antibióticos: Cloranfenicol, Florfenicol, Tetraciclina, Sulfonamida y derivados Nitrofuranos (Poobalane, 2007; Aoki, 1999).

Varios serotipos han sido aislados en diferentes peces y lugares a lo largo de los años, pero se han encontrado antígenos comunes entre las cepas virulentas (Aoki, 1999).

Aeromonas hydrophila presenta distribución cosmopolita y se transmite únicamente de forma horizontal. Se distribuye ampliamente en el agua y sedimentos de estanques de piscicultura, pudiendo transmitirse por las descargas intestinales y por lesiones externas de los peces (Aoki, 1999).

En humanos se la implica como agente causante de septicemia y peritonitis (Aoki, 1999). La infección se produce por la ingestión de agua y comida contaminada con la bacteria. *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii* biovar *sobria* son las principales responsables de causar enfermedad en humanos (Chopra y col., 2009). En las últimas décadas ha surgido un mayor interés por estudiar las *Aeromonas* debido a que algunas de sus especies se han aislado de pacientes

con infección gastrointestinal, resultando en un problema para la salud pública (Castro y col., 2003).



Tabla 1. Características bioquímicas de especies de *Aeromonas*.

Características	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. veronii</i> <i>bt</i> <i>sobria</i>
Indol	+	+	+
Gas de glucosa	+	-	+
Decarboxilación de:			
Lisina	+	-	+
Ornitina	-	-	-
Voges-proskauer	+	-	+
Argininadhidrolas	+	+	+
Beta hemolisis en sangre de cordero	+	-	
Acido de:			-
L-arabinosa	+	+	-
Lactosa	-	+	-
Sacarosa	+	+	+
m-inositol	-	-	-
Salicina	+	+	-
Celobiosa	V	+	V
D-Manitol	+	+	+

+ = positivo; - = negativo; v = variable; bt = biotipo (modificado de Castro y col., 2003)

3.2.5. Enfermedades causadas por *A. hydrophila* en peces

Uno de los principales síndromes patológicos en los que se demostró la implicancia de *A. hydrophila* es la Septicemia Hemorrágica Bacteriana (SHB), la misma se caracteriza por una bacteriemia que es seguida por la síntesis de toxinas, necrosis tisular y posterior fase clínica. Entre los principales signos clínicos y lesiones provocadas en el transcurso de esta afección se destacan: hiperemia de los capilares, exudación, hemorragias petequiales focales, y leucocitosis, que se acompañan generalmente por niveles importantes de melanomacrófagos circulantes, así como exoftalmia asociada con edema pre-orbital (Vásquez-Piñeros y col., 2010). En un trabajo realizado por Carnevia y colaboradores se caracterizó la enfermedad observada en nuestro país en tres formas clínicas principales: aguda septicémica, subaguda ascítica y crónica ulcerosa (Carnevia y col., 2010). Otros autores caracterizan a la enfermedad en cuatro categorías: sobreaguda (con una rápida y fatal septicemia con pocos síntomas), una forma aguda (con hidropesía, ampollas, abscesos y protrusión de escamas), una forma crónica ulcerativa (con forúnculos y abscesos) y una forma latente sin signos aparentes (Karunasgar y col, 1991).

La bacteria se multiplica en el intestino, provocando catarro hemorrágico. Los metabolitos tóxicos de *A. hydrophila* pasan a través del intestino e inducen toxemia. La hemorragia capilar ocurre en la dermis de las aletas y tronco del

pez, y en la submucosa del estómago. Las células hepáticas y el epitelio renal muestran degeneración. Los glomérulos son destruidos y el tejido se torna hemorrágico, con exudación de suero y fibrina (Aoki, 1999).

3.3. Sistema inmune en peces

El sistema inmune en los peces es similar al de los vertebrados superiores, y se caracteriza por reacciones específicas y no específicas (Kozinka y Antychowicz, 2000). Sin embargo se encuentran diferencias entre los sistemas inmunes de ambos grupos; en lo que respecta a localización y distribución de las células inmunes, tejidos y órganos, y sobre todo en los sitios donde se realiza la hematopoyesis. Los peces carecen de médula en los huesos, nódulos linfáticos y placas de Peyer. En su lugar se encuentran el riñón, timo, bazo y tejido linfoide asociado a mucosas. Este sistema incluye propiedades defensivas como la activación y aumento en número y tamaño de las células de moco branquiales e intestinales en respuesta a infecciones bacterianas o irritantes en el agua (Penagos y col., 2009). Los principales órganos linfoides son el timo (productor de células T) y el riñón anterior (productor de células B) (Midtlyng y col., 2011).

3.3.1. Sistema inmune innato.

Los componentes humorales del sistema inmune innato de los peces son numerosos, con diferentes funciones, entre los que se incluyen: inhibidores de crecimiento, varias enzimas líticas, componentes de la vía del complemento, aglutininas y precipitinas, anticuerpos naturales, citoquinas, quinocinas y péptidos antibacterianos (Midtlyng y col., 2011). Los macrófagos constituyen el componente principal en la respuesta inmune innata, son los principales fagocitos de los peces, presentadores primarios de antígenos en la respuesta inmune adquirida y son productores de citoquinas proinflamatorias. Tienen un papel importante en la aeromoniasis, ya que son usados por los patógenos como vehículo para llegar a múltiples órganos y evitar ser destruidos.

Dentro de los leucocitos granulares existentes en los peces, se encuentran los neutrófilos (heterófilos), eosinófilos (acidófilos) y basófilos. Los neutrófilos tienen funciones fagocíticas y bactericidas reducidas en algunas especies, en comparación con la encontrada en mamíferos, esto podría explicar la tendencia de los peces a presentar inflamaciones necróticas hemorrágicas más que de licuefacción. Los eosinófilos granulares se localizan en tracto gastrointestinal, branquias, piel, corazón y sistema nervioso central. Su función aun no es clara. Se ha demostrado que se movilizan en sangre en respuesta a infecciones bacterianas. Los centros melanomacrófaeos se encuentran fundamentalmente en el bazo, así como también en riñón, hígado, gónadas, tiroides y timo. Estos están constituidos por macrófagos, células reticulares, linfocitos y células plasmáticas. En infecciones los centros melanomacrófaeos aumentan en

número y sus macrófagos captan bacterias y en su interior aumentan la cantidad de pigmentos (Penagos y col., 2009).

3.3.2 Sistema inmune específico: Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas son glicoproteínas, en el suero representan aproximadamente el 40 a 50% de las proteínas totales. La inmunidad humoral adquirida en peces requiere del reconocimiento y unión de antígenos solubles circulantes a las células B diferenciadas en células de memoria y células plasmáticas que responden para producir y secretar anticuerpos antígeno específicos (Olabuenaga, 2000).

Los peces óseos son capaces de producir solo un tipo de inmunoglobulinas, la IgM, apareciendo como tetrámeros del monómero H_2L_2 , compuestas de cuatro cadenas polipeptídicas, dos pesadas (H) y dos ligeras (L) de gran heterogenicidad, con dominios variables que interaccionan específicamente con el antígeno con el que se combinan (Ruiz y col., 2003).

Recientemente se describieron dos isotipos más de inmunoglobulinas en peces óseos, la IgD y la IgT, las cuales aún no han sido caracterizadas funcionalmente (Rubio-Godoy, 2010).

Las inmunoglobulinas aparecen principalmente en plasma, moco y bilis, aumentando en estados de enfermedad (Penagos y col., 2009).

Las paredes de los vasos sanguíneos son permeables a las inmunoglobulinas del suero y por ello se encuentran en la mayoría de los fluidos tisulares, plasma, linfa y mucus epitelial. Las células productoras de anticuerpo derivan de linfocitos B, los cuales por interacción con el antígeno se transforman en células plasmáticas. Los macrófagos también colaboran en la presentación antigénica. La naturaleza del antígeno tiene mucha influencia en la respuesta a los anticuerpos, siendo esencial que la molécula sea reconocida como extraña para estimular el sistema inmune. Los antígenos más efectivos son aquellos de alto peso molecular, con estabilidad estructural y que sean moléculas químicamente complejas no inertes, como el caso de la mayoría de los complejos bacterianos y virales (Olabuenaga, 2000).

Algunas de las funciones de los anticuerpos son: capacidad de unión a la superficie de los virus e impedir así la infección celular, unirse a las membranas de bacterias e inducir por la vía clásica del complemento la lisis bacteriana o pueden actuar como opsoninas y facilitar el reconocimiento por las células fagocíticas, pueden además actuar como receptores de células B, participando en el reconocimiento de antígenos para la producción de anticuerpos (Penagos y col., 2009).

Los anticuerpos pueden clasificarse teniendo en cuenta su actividad biológica según Ruiz y col. (2003) en:

- Anticuerpos aglutinantes; los cuales son producidos frente a antígenos particulares en los que se induce la formación de agregados menos tóxicos y más fáciles de fagocitar.

- Anticuerpos precipitantes; precipitan antígenos de naturaleza soluble y son importantes como antitoxinas.
- Anticuerpos neutralizantes; neutralizan la acción del agente patógeno, mediante su unión a la membrana.

3.3.3. Producción de anticuerpos en peces.

En los peces la producción de anticuerpos es un proceso similar al que ocurre en mamíferos (Ruiz y col., 2003; Olabuenaga, 2000).

Las células presentadoras de antígenos, captan el antígeno y lo procesan para presentarlo en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II, a los receptores de antígenos de los linfocitos T y de esta forma se activan. Los linfocitos B se activan por la unión del antígeno entero a los receptores de superficie que son inmunoglobulinas. Así en las células B activadas se desencadena la proliferación y secreción de anticuerpos, para lo que es necesaria en ocasiones la asociación con las células T activadas. La colaboración entre estos tipos celulares requiere gran proximidad entre ellos, por lo que las interacciones se producen en órganos linfoides como bazo y riñón (Ruiz y col., 2003).

La activación de los linfocitos se inicia por la unión del antígeno a receptores específicos. Los receptores de los linfocitos B son formas de los anticuerpos secretados por la propia célula unidos a la membrana, y son capaces de reconocer gran variedad de antígenos (haptenos, grandes proteínas, carbohidratos, etc.). En contraste, las células T solo son capaces de reconocer pequeños péptidos, por lo que necesitan que las células presentadoras de antígeno, lo procesen y lo presenten bajo esa forma. Existen antígenos T dependientes, que inducen la respuesta humoral mediante la colaboración de linfocitos T, y antígenos T independientes, que son moléculas suficientemente grandes capaces de estimular directamente a los linfocitos B (Ruiz y col., 2003).

En los peces existen dos factores que influyen en la producción de anticuerpos, ellos son los cambios estacionales y la temperatura (Olabuenaga, 2000).

La síntesis de anticuerpos es temperatura dependiente y las fases tempranas de la respuesta inmune son sensibles a diferencias en ella (Desvaux y Charlemagne, 1981; Rubio-Godoy, 2010).

Cuánto más alta es la temperatura dentro del rango fisiológico normal de cada especie, más corta es la fase de inducción y más alta es la magnitud de la respuesta inmune. A bajas temperaturas la fase de inducción se prolonga con una reducción en el título de anticuerpos o hay ausencia completa de la respuesta (Olabuenaga, 2000).

La edad a la cual tiene lugar un montaje adecuado y maduro de la respuesta humoral varía según las distintas especies y depende también de las condiciones ambientales. En general una respuesta completa ocurre entre los 2 a 10 meses, después de la incubación (Olabuenaga, 2000).

3.3.4. Memoria inmunológica.

El hecho de que se pueda inmunizar o vacunar a los peces pone de manifiesto la presencia de un fenómeno de memoria inmunológica. Este proceso permite al organismo producir una respuesta inmune mucho más rápida y eficaz en el segundo o siguientes encuentros con el antígeno. En general la respuesta secundaria es más débil en peces que en mamíferos, pero los títulos de anticuerpos en esta segunda respuesta alcanzan niveles entre dos y ocho veces superiores a los de la primera, y la cantidad de antígeno necesaria para desencadenarla es menor. En mamíferos la respuesta puede verse aumentada cincuenta a cien veces en comparación con la primera, siendo el caso de una estimulación antigénica T- dependiente (Desvaux y Charlemagne, 1981; Ruiz y col., 2003).

Algunos estudios demuestran que el desarrollo de la memoria se debe a un aumento en el número de células B precursoras, y no a una mayor capacidad de proliferación de estas células, como sucede en mamíferos, mientras que otros han descrito la gran capacidad de expansión y proliferación clonal de las células B. No obstante la producción de una respuesta secundaria en inmunizaciones está condicionada por numerosos factores, como la dosis de inmunización primaria, la ruta de administración, y el tiempo transcurrido entre los dos contactos con el antígeno (Ruiz y col., 2003).

3.4. Vacunación en peces

Los acuicultores necesitan controlar las enfermedades específicas que llevan a la muerte de una gran cantidad de peces (Austin, 1984).

Varios científicos han estudiado la vacunación en peces, principalmente las reacciones específicas involucradas en la respuesta a la acción de un antígeno. La eficacia de la vacunación es frecuentemente evaluada por el incremento de anticuerpos específicos aglutinantes.

La inmuno profilaxis que estimula tanto al sistema inmune específico como al no específico es la llave para el desarrollo sustentable de la acuicultura (Bailone y col., 2010).

Históricamente, la primer tentativa de desarrollo de una vacuna bacteriana para peces, fue en Salmón salvaje (*Salmo clarkii*) contra la forunculosis causada por *Aeromonas salmonicida*, inactivándose las células bacterianas con cloroformo. Desde entonces se han formulado inmunógenos para muchos de los patógenos de peces (Austin, 1984). Es fundamental conocer los tejidos por los que ingresa el patógeno para asegurar una adecuada estimulación del sistema inmune en esos sitios. La gran mayoría de las bacterias que causan enfermedad en los peces, ingresan por el tracto gastrointestinal (*Aeromonas spp.*, *Vibrio spp.*, *Edwardsiella spp.*, *Lactococcus spp.*, entre otras), y por la piel y/o branquias (*Streptococcus iniae* y *Aeromonas spp.* entre otras) (Penagos y col. 2009).

Varias vacunas han sido desarrolladas contra *A. hydrophila*, aunque no existe aún un producto comercial disponible. La incapacidad de estas vacunas de

tener una protección cruzada contra los diferentes aislados de *A. hydrophila* puede deberse a la heterogeneidad (tanto bioquímica como serológica) que presenta esta bacteria (Poobalane y col., 2010).

Las vacunas experimentales contra ciertas enfermedades del cultivo de peces son corrientemente testeadas, y si bien algunas de ellas logran una protección satisfactoria en las investigaciones de los laboratorios, la mayoría tienen problemas relacionados al costo de producción, conveniencia de la administración, seguridad o potencia inadecuada (Ellis, 1988).

Para la confección de vacunas contra *Aeromonas hydrophila* se han usado células enteras inactivadas, mostrando una efectividad buena, con un 78% de protección relativa. El uso de la formalina para la inactivación, ha dado buenos resultados para ésta y otras bacterias de relevancia en ictiopatología (Austin, 1984).

3.4.1. Vías de administración de las vacunas

A continuación se reseñan los principales métodos de inmunización empleados en acuicultura según Austin (1984):

-Inyectable (con o sin adyuvante): ésta técnica es lenta y puede requerir de anestesia previa para los peces. Es útil solo para peces grandes y de valor.

La inyección intraperitoneal requiere que el animal tenga más de 15 g de peso, es la vía más efectiva para generar protección, asegurando una dosis idéntica en todos los individuos, además permite la adición de adyuvantes con los cuales se logra protección por más tiempo. Sin embargo, las dificultades de implementación, los costos, el estrés excesivo que induce en los peces, además de la poca viabilidad en peces pequeños, y a la poca estimulación de inmunidad de superficie, hacen que este método de inmunización sea utilizado en ciertas especies de peces, en determinados patógenos y a sistemas de producción particulares.

La inyección intramuscular principalmente se usa para vacunas de ADN (Penagos y col., 2009)

-Vía oral: con este método se puede vacunar y alimentar a los peces a la misma vez fácilmente y sin causarles estrés (Rombout y col., 2010; Tu y col., 2009). Sin embargo puede haber problemas con la degradación de la vacuna en el tracto gastrointestinal.

-Inmersión en una solución o suspensión de inmunógeno: este método es rápido y fácil, permitiendo la vacunación de un gran número de peces.

-Baño en vacuna muy diluida por periodo prolongado (varias horas): vía económica. Esta técnica puede ser llevada a cabo en los periodos de confinamiento, como ser durante el transporte de los stocks.

-Pulverización o ducha de la vacuna. Puede utilizarse cuando los peces circulan en cintas transportadoras durante la rutina de clasificación, mediante el empleo de una máquina automática que expela la vacuna (Austin, 1984).



-Infiltración hiperosmótica. Se trata de una inmersión de los peces en una solución salina fuerte, seguida de un baño con la vacuna. Es un método muy estresante para los peces (Austin, 1984).

-Intubación anal. Este método ofrece como ventajas el evitar el paso de la vacuna por el estómago y el intestino. Pero es una técnica pesada y requiere más desarrollo (Austin, 1984).

Es difícil determinar cuál es el método más efectivo en cuanto a la aplicación de las vacunas. La información disponible sugiere que la administración oral es dentro de las opciones la última para elegir, sin embargo ha funcionado en *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *Flexibacter columnaris*, *Pasteurella piscicida*, *Vibrio anguillarum*, *V. ordalii* y *Yersinia ruckeri* (Austin, 1984).

Se han probado vacunas experimentales para la prevención de la enfermedad por *A. hydrophila*, utilizando las vías intramuscular e intraperitoneal, y se vio que la vacuna generaba protección. Los títulos de anticuerpos en los sueros de peces inmunizados aumentaron. Como los tipos serológicos de *A. hydrophila* son heterogéneos, se piensa que es necesario lograr una vacuna polivalente contra esta infección (Aoki, 1999).

4. Hipótesis

Carassius auratus inmunizados con bacterina de *Aeromonas hydrophila* tendrían en promedio mayor sobrevivencia a la infección experimental con dicha bacteria.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Evaluar el nivel de protección conferido por una vacuna confeccionada en base a bacterina de *Aeromonas hydrophila* administrada por vía intraperitoneal en *Carassius auratus*.

5.2. Objetivos particulares

- Determinar la DL_{50} de cepas locales de *Aeromonas hydrophila* a partir de desafíos experimentales por vía intraperitoneal en *Carassius auratus*.
- Confeccionar una vacuna tipo bacterina con una cepa local de *A. hydrophila* e inmunizar *Carassius auratus* por vía intraperitoneal.
- Medir el nivel de anticuerpos específicos desarrollados por los peces inmunizados
- Comparar la tasa de sobrevivencia al desafío intraperitoneal con *A. hydrophila* entre *C. auratus* inmunizados y no inmunizados.

6. Materiales y Métodos

6.1. Sujetos de experimentación

Se utilizaron *Carassius auratus* obtenidos de un criadero comercial de peces ornamentales. Los mismos provenían de un mismo desove y poseían una edad estimada en seis meses.

6.2. Alojamiento de los animales

Durante el desarrollo de las experiencias los peces se alojaron en acuarios de vidrio de 20 litros de capacidad como lo muestra la Figura 1, a una densidad de un pez por litro de agua, realizándose una renovación diaria de agua correspondiente al 25% del volumen total. Cada acuario contó con filtro biológico - mecánico, aireación y calefactor de agua de modo tal de mantener una temperatura constante de entre 23 y 25°C. Durante las experiencias los animales fueron alimentados con ración balanceada para peces (pellet flotante con 38% de proteína bruta) *ad libitum*.



Figura 1. Alojamiento de los peces.

6.3. Origen de las bacterias empleadas

Se utilizó una cepa de *A. hydrophila* obtenida de un caso clínico observado en un esturión (*Acipenser sp.*) mantenido en condiciones intensivas de cultivo en una piscicultura nacional. El aislamiento se realizó a partir de la siembra en medio TSA de un hisopado de riñón. La identificación bacteriana se realizó mediante el empleo del *kit* diagnóstico API 20 NE[®] de Biomerieux (Topic y col., 2007). Este método incluye 20 test bioquímicos que permiten determinar las características metabólicas de las bacterias objeto de identificación ya sean gram positivas como gram negativas.

Previo a los ensayos de infección y confección del inmunógeno, se realizaron dos pasajes por *Carassius auratus* con la cepa bacteriana para aumentar su virulencia (Vásquez-Piñeros y col., 2010; Rahman y col., 2001).

6.4. Determinación de DL₅₀

Para determinar la dosis de *A. hydrophila* capaz de inducir una mortalidad del 50% en poblaciones no inmunizadas de *C. auratus* se realizaron infecciones experimentales con diferentes concentraciones bacterianas suspendidas en PBS estéril, las que fueron administradas por vía intraperitoneal una dosis de 0,2 mL.pez⁻¹ de volumen total del inoculo. La concentración mínima de bacterias en la suspensión a inocular fue de 0,5 en la escala *Mc Farland* (1.5×10^8 ufc.mL⁻¹) aumentando progresivamente en dicha escala hasta que se obtuvo elevados porcentajes de mortalidad según metodología descrita por Negrete y col. (2004) y Pereira y col. (2006).

Se confeccionaron 5 grupos de 10 peces para testear cada una de las dosis a evaluar, manteniendo un grupo control en idénticas condiciones que fue inoculado vía intraperitoneal con PBS estéril.

Con los datos obtenidos se hizo un análisis de regresión y cálculo de percentil 50 mediante el empleo del *software* Statgraphic Plus 5.1.

Se registraron signos clínicos y mortalidad diariamente dentro de los 15 días post infección. Se realizó necropsia y muestreo bacteriológico de los animales muertos durante la experiencia y de un número representativo de sobrevivientes según técnica descrita por Noga (1996).

6.5. Confección de la vacuna e inmunización de los animales

La vacuna se confeccionó a partir de un cultivo puro de la cepa de *A. hydrophila* descrita anteriormente obtenido en caldo BHI. El mismo fue centrifugado durante 30 minutos a 3500 rpm y luego de descartar el sobrenadante se resuspendió el pellet en formalina al 3% en una relación 1:40 (v/v) durante 24 horas. Una vez cumplido este plazo se centrifugó nuevamente, resuspendiendo el pellet esta vez en PBS estéril, paso este último que se repitió tres veces con la finalidad de obtener bacterina libre de formalina.

Finalmente se realizó una suspensión final en PBS de las bacterias inactivadas hasta alcanzar una concentración de células equivalente a 5 en la escala *Mc Farland* (aproximadamente 15×10^8 ufc.mL⁻¹) la que se almacenó a 4°C hasta el momento de su empleo.

Los peces fueron inmunizados por vía intraperitoneal con la vacuna descrita anteriormente a una dosis de 0,2 mL por animal.

6.6. Evaluación de la protección conferida por la vacunación

6.6.1. Titulación de anticuerpos

Se evaluó el nivel de anticuerpos generados por los peces inmunizados con bacterina de *A. hydrophila* mediante el empleo de la técnica de aglutinación en placa. Diluciones sucesivas de sueros obtenidos de animales inmunizados a los 7, 15 y 30 días posvacunación fueron enfrentados, en una placa de 96 pocillos, a la bacterina con la que fueron inmunizados, observándose luego de

24 horas de incubación en cámara húmeda a temperatura ambiente la formación o no de complejos antígeno-anticuerpo (ver Figura 2). Se empleó como control positivo de la técnica suero de esturión siberiano con anticuerpos específicos titulados y como control negativo antígeno solo (Bailone y col. 2010).

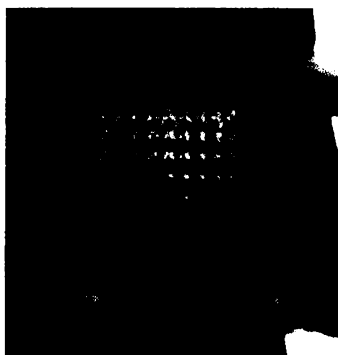


Figura 2. Placa de aglutinación.

6.6.2. Supervivencia a la infección experimental

Se realizaron desafíos experimentales con *A. hydrophila* por vía intraperitoneal en *C. auratus* previamente inmunizados con bacterina específica con la finalidad de evaluar la supervivencia de los mismos a la infección. La dosis de bacterias empleada fue por lo menos dos veces superior a la DL_{50} calculada previamente. Se empleó como control la inoculación de bacterias en las mismas condiciones en peces no inmunizados. Con los resultados obtenidos se calculó el porcentaje de supervivencia relativa (Poobalane, 2007).

6.7 Sacrificio de peces

En los casos en que fue necesario sacrificar animales se realizó mediante sobredosis de anestésico en baño, empleándose con dicho fin Eugenol al 10% en solución alcohólica a una dosis de 1 mL.litro⁻¹ de agua, según técnica descrita por Carnevia y col. (2010).

6.8 Análisis estadístico de los datos

La DL_{50} de *A. hydrophila* para *C. auratus* se obtuvo a partir del cálculo del percentil 50 en la curva de mortalidad vs concentración bacteriana según Vásquez-Piñeros, y col. (2010) y Hamilton, y col. (1977)

Los porcentajes de supervivencia relativa obtenidos para los grupos de peces inmunizados y no inmunizados se compararon mediante test de Chi cuadrado.

En todos los casos en que fue necesaria la realización de análisis estadísticos se empleó el software Statgraphic Plus 5.1.

7. Resultados

7.1. Determinación de la DL50

En la Tabla 2 se presentan las tasas de mortalidad de *C. auratus* obtenidas a partir de la infección experimental con *A. hydrophila*.

Tabla 2. Mortalidad de *Carassius auratus* inoculados con diferentes concentraciones de *A. hydrophila*.

Grupo	N° peces inoculados	Dosis (ml)	Concentración (escala Mc Farland)	N° aprox. Bact ($\times 10^8$)	Mortalidad total/grupo	Mortalidad %
1	10	0,2	0,5	1,5	4	40 %
2	10	0,2	1	3	7	70%
3	10	0,2	4	12	9	90%
4	10	0,2	PBS (estéril)	0	0	0%

En los peces del grupo 1 la primer muerte se dio a las 24 horas pos-inoculación, las tres muertes restantes ocurrieron 48 horas pos-inoculación. La mortalidad acumulada en los 15 días fue de 40%.

En el grupo 2 apareciendo las primeras muertes (4 peces) a las 24 horas pos-inoculación y el resto a las 48 y 72 horas. La mortalidad acumulada en este caso fue del 70%

En el grupo 3, las primeras muertes (4 peces) aparecieron a las 12 horas y los restantes cinco peces a las 48 horas. La mortalidad acumulada fue del 90%.

El grupo control, no presentó mortalidad alguna.

En la Figura 3 se muestra la relación existente entre la concentración bacteriana del inoculo de *A. hydrophila* y la mortalidad inducida a partir de la infección experimental en *C. Auratus*.

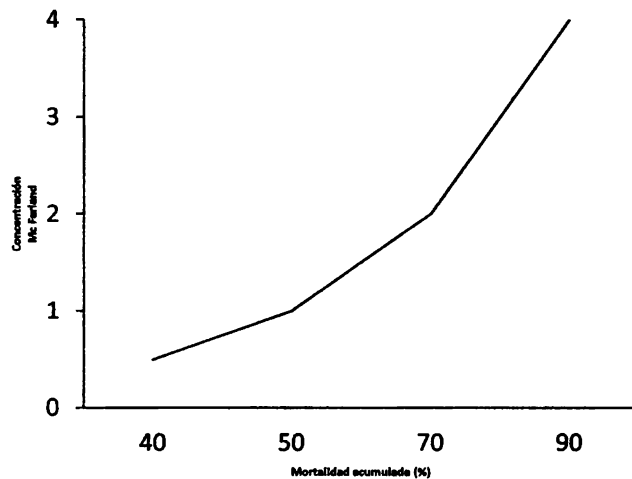


Figura 3. Concentración del inoculo bacteriano vs mortalidad acumulada para el cálculo de la DL₅₀.

La ecuación de la curva que mejor explica este modelo (86,41%, $p=0,0462$) es:
 $y = 0,0828 + 0,4502\sqrt{x}$

Por lo tanto el cálculo de percentil 50 es: $(y - 0,0828)^2 \cdot 0,4502^{-2} = 0,858$

Teniendo en cuenta este resultado y a efectos prácticos se empleó una concentración de bacterias equivalente 1 en la escala Mc Farland como DL₅₀.

7.2. Signos Clínicos

A los peces encontrados muertos en cada uno de los acuarios, se les realizó tanto examen externo como interno. En el examen externo se encontró que los peces se encontraban con opacidad en la piel, edema a nivel ventral, los opérculos se encontraban con petequias y en algunos casos el abdomen presentaba ulceración de la piel y músculo, llegando a observarse el interior de la cavidad abdominal a través de soluciones de continuidad (ver Figura 5).

En lo que respecta al examen interno se observó; hemorragias petequiales en bazo, hígado e intestino, contenido ascítico seroso o serosanguinolento, además de abscesos en peritoneo, bazo e hígado (ver Figura 4). Correspondiendo estos hallazgos con los provocados por la forma aguda septicémica de la Septicemia Hemorrágica Bacteriana.



Figura 4. Ejemplar de *Carassius auratus* con ascitis.



Figura 5. *Carassius auratus* presentando lesiones ulcerosas a nivel abdominal.

Se realizó además muestreo microbiológico a partir de riñón, hígado y líquido ascítico en medio TSA, obteniendo crecimiento típico de las colonias de *A. hydrophila* en placa luego de las 48hs como se muestra en la Figura 6.



Figura 6. Colonias de *Aeromonas Hydrophila* en medio TSA.

7.3. Titulación de anticuerpos

En la Figura 7 se presentan los resultados de titulación de anticuerpos obtenidos de la microaglutinación en placa.

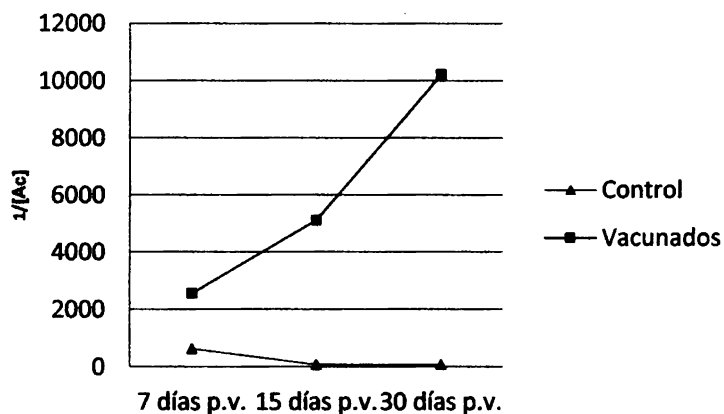


Figura 7. Dilución máxima de sueros de *Carassius auratus* (vacunados y control) en la que se observó aglutinación positiva a *Aeromonas hydrophila*.

7.4. Supervivencia a la infección experimental

A los 7 días post infección la supervivencia obtenida fue de 76% en el lote vacunado frente a 0% en el lote control. El nivel de anticuerpos contra *A. hydrophila* en los peces vacunados fue significativamente superior que en los no vacunados (Estadístico Kolmogorov-Smirnov 1,4142 con $p=0,0366$),

8. Discusión

El efecto de *A. hydrophila* en los peces puede variar de acuerdo, entre otras cosas, a su resistencia frente a la infección. Santos y col., 1991 han determinado la DL₅₀ para *A. hydrophila* en diferentes especies de peces, como ser: *Salmo trutta* (2×10^5 células.mL⁻¹), *Anguila japonica* ($>10^8$ células.mL⁻¹), *Plecoglossus altivelis* ($8,6 \times 10^4$ células.mL⁻¹), *Lepomis macrochirus* ($>10^8$ células.mL⁻¹). Para estos autores, la virulencia de cada cepa bacteriana varía notablemente, por ejemplo para el pez *Onchorhynchus mykiss* la DL₅₀ se encuentra entre 3.2×10^4 a 3.2×10^8 células.mL⁻¹. Sugieren además que la DL₅₀ puede variar según el peso o tamaño del pez (Oliveira y col., 2011). Para Bailone y col. 2010, la DL₅₀ en tilapias inoculadas intraperitonealmente fue de 1×10^7 ufc.mL⁻¹.

Brenden y Huizinga (1986) hallaron un valor de DL₅₀ igual a 5×10^5 ufc.mL⁻¹ de *A. hydrophila* en *Carassius auratus*.

En nuestro ensayo la DL₅₀ fue de *Mc Farlan* 1, lo que equivale a una concentración de bacterias aproximada de 3×10^8 ufc.mL⁻¹ calculada a partir de la gráfica de concentración vs. mortalidad acumulada.

En comparación con otros autores que han trabajado con *Carassius auratus*, nosotros hemos encontrado una DL₅₀ mayor. Esto puede indicar que la DL₅₀ para una determinada bacteria no es constante y que depende de las condiciones y parámetros utilizados en cada estudio. Deben considerarse factores propios de los peces utilizados como ser; resistencia natural a la infección, edad, estado nutricional y tamaño de los ejemplares. La temperatura a la cual son mantenidos los peces y el estrés generado por la manipulación durante el ensayo. Entre los factores dependientes del patógeno, se encuentran las características biológicas propias del patógeno, particularidades de sus antígenos y sus interacciones con el sistema inmune de los peces.

Según Rey y col, 2009, se han llevado a cabo varios estudios evaluando la virulencia (DL₅₀) de diferentes cepas de *A. hydrophila* pero los factores ambientales estresantes involucrados en el comienzo de la enfermedad, la vía de ingreso de la bacteria, su distribución dentro del pez y la evolución del proceso patológico, han sido escasamente evaluados. Rahman y col. (2001) observaron que la vía intraperitoneal provocó mayor poder de virulencia (10 veces superior a la encontrada utilizando otras vías de administración) de *A. hydrophila* en *Carassius*. Por lo cual en este ensayo se utilizó con el fin de reproducir la enfermedad, logrando sintomatología clara de SHB, así como para poder inocular una dosis uniforme que nos permitiera calcular la DL₅₀.

La diversidad antigénica de *A. hydrophila* es uno de los puntos que causa mayores problemas en el desarrollo de vacunas contra dicha bacteria. Según Cipriano (2001), se han encontrado diferentes cepas de *Aeromonas* móviles obtenidas de una misma población de peces, e incluso de diferentes órganos

de un mismo pez. Por lo que las bacterinas monovalentes inicialmente preparadas contra *A. hydrophila* solo alcanzaban niveles aceptables de protección contra los desafíos con bacterias homólogas. Los peces no se encontraban inmunizados para infecciones con cepas heterólogas (Cipriano, 2001). La elevada efectividad de nuestro ensayo de protección (76% de sobrevivencia en el grupo vacunado contra 0% en el grupo control) puede estar relacionada con el hecho de que tanto la confección de la vacuna como los desafíos, se realizaron a partir de una misma cepa de *A. hydrophila*.

Si bien la vía intraperitoneal no es la más adecuada cuando se manejan grandes volúmenes de peces, en este ensayo en particular fue útil ya que nos permitió controlar la dosis de bacterina por pez. En ensayos realizados en carpa común, inmunizados vía intraperitoneal se observó mayor circulación de anticuerpos que aquellos vacunados por vía oral (Cipriano, 2001).

Es de destacar que en nuestro ensayo los carassius respondieron a la inmunización, produciendo anticuerpos contra *A. hydrophila* y mostraron protección frente a la infección experimental posterior. Prasad y Areechon (2010) hablan de una elevada naturaleza antigénica de *A. hydrophila*, ya que observaron altos títulos en tilapias inyectadas con *A. hydrophila* inactivadas con formalina. Esta vacuna pudo inducir respuesta humoral y una buena protección en tilapias rojas contra desafíos virulentos de *A. hydrophila*.

Si bien la vacuna es monovalente, mostró una elevada efectividad ante un desafío bastante agresivo como el que se llevó a cabo, pudiendo tomarse como punto de partida para la realización de futuras investigaciones que nos permitan llegar a obtener una vacuna polivalente de *A. hydrophila*, y el testeo de otras vías de administración más aplicables masivamente.

Estos resultados preliminares permiten demostrar la efectividad de la inmunización con esta bacterina en carassius, hecho de gran importancia para nuestros acuicultores, ya que podrían lograr una adecuada protección contra cepas locales de *A. hydrophila*. Pudiendo llegar a utilizar vías de vacunación menos invasivas para los peces y de menor complejidad a la hora de su administración.

9. Conclusiones

En las condiciones en que se llevó a cabo nuestra investigación fue posible demostrar la respuesta positiva en la generación de anticuerpos frente a la vacunación por vía intraperitoneal con bacterina de *Aeromonas hydrophila* en *Carassius auratus*.

A su vez pudimos corroborar la efectividad de dicha inmunización al obtener una sobrevivencia a la infección experimental con cepa homóloga significativamente superior (76%) en el lote de peces vacunados frente al lote control (0%).



10. Referencias Bibliográficas.

1. Austin B (1984). The future of bacterial fish vaccines. *Vaccine*. 2: 249-254.
2. Austin B, Austin D (2007). *Bacterial fish pathogens. diseases of farmed and wild fish*. Springer 4taed. P. 594 UK.
3. Aoki T (1999). Motile Aeromonads (*Aeromonas hydrophila*). *Fish diseases and disorder*. 3:427-453.
4. Bailone RL, Martins ML, Mouriño JLP, Vieira FN, Pedrotti FS, Nunes GC, Silva BC (2010). Hematology and agglutination titer after polyvalent immunization and subsequent challenge with *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Archivos de Medicina Veterinaria*. 42: 221-227.
5. Brenden RA, Huizinga HW (1986). Pathophysiology of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish, *Carassius auratus* (L.). *Journal of Fish Diseases*. 9: 163-167.
6. Carnevia, D (2008). Análisis de las oportunidades de cultivo de especies acuáticas en Uruguay. Montevideo, DINARA-FAO. p.68.
7. Carnevia D, Chaves L, Friss de Kereki C (2003). Caracterización de siete cepas de *Aeromonas hydrophila* (Bacteria, Aeromonadaceae) aisladas de peces ornamentales tropicales de Uruguay. Disponible en: <http://www.civa2003.org> 966-970 Fecha de consulta: 30/03/2011
8. Carnevia D, Letamendia M, Perretta A, Delgado E (2010). Caracterización de Septicemia Hemorrágica Bacteriana (SHB), diagnosticadas en peces ornamentales de Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*. 46: 27-32.
9. Castro G, Aguilera MG, Hernández CH, Arteaga RI, Carmona AA, Pérez A, Giono S, Figueras MJ, Aparicio G (2003). La identificación genética de *Aeromonas*, una realidad y una necesidad para la microbiología diagnóstica. *Bioquímica*. 28: 11-18.
10. Chopra AK, Graf J, Horneman AJ, Johnson JA (2009). Virulence factor-activity relationship (VFAR) with specific emphasis on *Aeromonas* species (spp) *Journal of Water and Health* 07:29-54.
11. Cipriano CC (2001). *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. *Fish Disease Leaflet* 68. Disponible en:

12. Costa AB (2003). Caracterizacáo de bacterias do complexo *Aeromonas* isoladas de peixes de água doce e sua Actividade Patogena. Tesis de doctorado.Universidad de São Pablo.

Disponible en: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11139/tde-15072003-135844/pt-br.php> Fecha de consulta: 31/01/2012

13. Ellis AE (1988). Current aspects of fish vaccination.Review.Diseases of aquatic organisms. 4:159-164.

14. Fang HM, Ling KC, Tan YL, Ge R, Sin YM (1998). In vitro inhibition of epithelial cell invasion by *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio* species by fish *Aeromonas hydrophila* mayor adhesion. Journal of Fish Diseases.21:273-280.

15. Fuentes JM, Pérez JA (1998). Aislamiento de *Aeromonas hydrophila* en trucha (*Oncorhynchus mykiss*). Veterinaria México. 29(1):117-119.

16. Hamilton MA, Russo RC, Thurston RV (1977) Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays. Environmental Science and Technology.11: 714-719.

17. Harikrishnan R, Balasundaram C, Kim MC, Kim JS, Han YJ, Heo MS (2009). Innate immune response and disease resistance in *Carassius auratus* by triherbal solvent extracts. Fish and Shellfish immunology. 27: 508-515.

18. Janda JM, Abbott S (2010). The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and infection. Clinical Microbiology Reviews. 23(1):35-73.

19. Karunasgar I, Rosalind G, Karunasgar I (1991). Immunological response of the Indian major carps to *Aeromonas hydrophila* vaccine. Department of fishery microbiology.Journal of fish diseases. 14: 413-417.

20. Kozinka A, Antychowicz J (2000). Influence of an experimental *Aeromonashydrophila* vaccine on selected haematological values and non-specific immunity in carp (*Cyprinus carpio* L.) Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy. 44: 169-178.

21. Li A, Yang W, Hu J, Wang W, Cai T, Wang J (2006). Optimization by ortogonal array design and humoral immunity of the bivalent vaccine against *Aeromonashydrophila* and *Vibrio fluvialis* infection in crucian carp (*Carassius auratus*. L.) *Aquaculture Research*. 37: 813-820.
22. Li X, Shuai J, Fang W (2006). Protection of *Carassius auratus gibelio* against infection by *Aeromonas hydrophila* using specific immunoglobulins from hen egg yolk. *Journal of Zhejiang University Science B*. 7(11): 922-928.
23. LU (2011). Three Rs approaches in the production and quality control of fish vaccines. *Biologicals*. 39: 117-128.
24. Marchalonis JJ (1971). Isolation and Partial Characterization of Immunoglobulins of Goldfish (*Carassius auratus*) and carp (*Cyprinus carpio*). *Immunology*. 20: 161-173.
25. Midtlyng PJ, Hendriksen C, Balks E, Bruckner L, Elskén L, Evensen O, Fyrand K, Guy A, Halder M, Hawkins P, Kisen G, Romstad AB, Saloniús K, Smith P, Sneddon
26. Negrete P, Romero J, Arredondo JL (2004). Resistencia a antibióticos y presencia de plásmidos en *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis* y *Vibrio funissii*, aislados de *Carassius auratus auratus*. *Veterinaria México*. 35(1): 21-30.
27. Noga, EJ (1996). *Fish disease, diagnosis and treatment*. Iowa, Mosby, p.367.
28. Olabuenaga SE (2000). *Fish immune system*. Gayana (Concepción). 64(2): 205-215.
29. Oliveira SR, Souza RT, Brasil EM, Andrade JI, Nunes E, Ono EA, Affonso EG (2011). LD50 of the bacteria *Aeromonas hydrophila* to *matrinxa*, *Bryconamazonicus*. *Acta Amazonica*. 41(2):321-326.
30. Panné S, Luchini L (2008). *Panorama actual del comercio Internacional de Peces Ornamentales*.
Disponibile:http://www.minagri.gob.ar/site/pesca/acuicultura/06_Publicaciones/_archivos/081110_Panorama%20actual%20de%20comercio%20internacional%20de%20Peces%20Ornamentales.pdf?PHPSESSID=134ad4da85eedcf3e8d2347e5c4677a9
Fecha de consulta: 31/01/2012.

31. Penagos G, Barato P, Iregui C (2009) Sistema inmune y vacunación de peces. *Acta Biológica Colombiana*. 14(1): 3-24.
32. Pereira DJ, Pereira HC, Carneiro DO, Gomez CA (2006). Concentracao inhibitoria mínima de Oxitetraciclina para aislados de *Aeromonas hydrophila* obtidos de diferentes fontes. *Ciencia e Agrotecnologia, Larvas*. 30(6): 1190-1195.
33. Pin M (1995). *Aeromonas spp* Mòviles: Factores de virulencia en cepas aisladas de alimentos y de heces diarreicas humanas. Universidad complutense de Madrid. Facultad de veterinaria. Departamento de Nutriciòn y Bromatologia III.
Disponible: <http://eprints.ucm.es/tesis/19911996/D/2/AD2006501.pdf>
Consultado: 31/01/2012
34. Plant KP, La Patra SC (2011). Advances in fish vaccine delivery. *Developmental and Comparative Immunology*. 35: 1256-1262.
35. Poobalane S (2007). *Aeromonas hydrophila* Vaccine Development using Inmunoproteomics. Disponible: <http://hdl.handle.net/1893/195> Consultado: 31/01/2012.
36. Poobalane S, Thompson KD, Ardó L, Verjan N, Han HJ, Jeney G, Hirono I, Aoki T, Adams A (2010). Production and efficacy of an *Aeromonas hydrophila* recombinant S-layer protein vaccine for fish. *Vaccine*. 28: 3540-3547.
37. Prasad S, Areechon N (2010). Efficacy of Formalin-killed *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus sp.* Vaccine in Red Tilapia. *Our Nature*. 8:231-240.
38. Rahman MH, Suzuki S, Kawai K (2001). The effect of temperatura on *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish, *Carassius auratus*. *Journal of Applied Ichthyology*. 17: 282- 285.
39. Rey A, Verján N, Ferguson HW, Iregui C (2009). Pathogenesis of *Aeromonas hydrophila* strain kj 99 infection and its extracellular products in two species of fish. *Veterinary Record*. 164:493-499.
40. Ribeiro FA, Lima MT y Batista CJ (2010). Panorama do Mercado de organismos aquaticos ornamentales. *Boletim Sociedade Brasileira de Limnologia*. 38(2) Setembro 2010.

41. Rocha A, Coll JM (2000). Investigación actual en vacunas para la acuicultura. Revista AquaTIC, nº 11.
Disponible: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=h&c=96>
Consultado: 31/01/2012
42. Rombout JH WM, Abelli L, Picchiatti S, Scapiagliati G, Kiron V (2010). Teleost intestinal immunology. *Fish and Shellfish immunology*.30:1-11.
43. Rubio-Godoy M (2010). Inmunología de los peces óseos. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 1(1):47-57.
44. Ruiz I, Fernández AB, Blas I (2003). El sistema inmune de los teleosteos (III): Respuesta inmune específica. *Revista AquaTIC*. 18:33-38.
45. Santos Y, Bandin I, Nieto TP (1991). Cell surface associated properties of fish pathogenic bacteria. *Journal of Aquatic Animal Health*. 3:279-301.
46. Swift S, Karlyshev AV, Fish L, Durant EL, Winson MK, Ram S, Williams P, Macintyre S, Stewart G (1997). Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*: Identification of the Lux RI homologs AhyRI and AsaRI and their cognate N-Acylhomoserine Lactone signal molecules. *Journal of Bacteriology*. 179(17):5271-5281.
47. Topic N, Coz-Rakovac R, Strunjak-Perovic (2007). Commercial phenotypic tests (API 20E) in diagnosis of fish bacteria: a review. *Veterinarni Medicina*. 52(2): 49-53.
48. Tu FP, Chu WH, Zhuang XY, Lu CP (2009). Effect of oral immunization with *Aeromonas hydrophila* ghosts on protection against experimental fish infection. *Letters in Applied Microbiology*.50:13-17.
49. Vásquez-Piñeros MA, Rondon-Barragán LS, Restrepo- Betancur LF, Eslava-Mocha PR (2010). Estudio clínico y hematológico de una infección experimental con *Aeromonas hydrophila* y *Edwardsiella tarda* en tilapia, *Oreochromis sp.* *Orinoquia*. 14(1):33-44.
50. Yin G, Ardó L, Thompson KD, Adams A, Jeney Z, Jeney G (2009). Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Ganoderma lucidum*) enhance immune response of carp, *Cyprinus carpio*, and protection against *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish immunology*. 26:140-145.