



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

**CARACTERIZACIÓN DEL CUADRO CLÍNICO, LEUCOGRAMA DIFERENCIAL Y
HALLAZGOS DE NECROPSIA EN ESTURIÓNES SIBERIANOS (*ACIPENSER
BAERII*) INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON *AEROMONAS
HYDROPHILA* (BACTERIA: AEROMONADACEAE)**

Por

**PACHER PINTOS, Carla María
PEREZ SARAIVA, Esteban Daniel**

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

Orientaciones: Medicina y Producción Veterinaria

MODALIDAD Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2016**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis aprobada por:

Presidente:

Dr.

Segundo miembro:

Dr. Alejandro Perretta

Tercer miembro:

Dr.

Fecha de aprobación:

Autores:

Carla María Pacher Pintos

Esteban Daniel Pérez Saravia

AGRADECIMIENTOS

A nuestra familia un gracias eterno.

A nuestro tutor Alejandro por su entera disponibilidad.

Lorena Maurente

A nuestros amigos

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE CUADROS	6
1. RESUMEN	7
2. SUMMARY	8
3. INTRODUCCIÓN	9
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
4.1. Esturión Siberiano (<i>Acipenser baerii</i>)	9
4.1.1. Antecedentes históricos sobre su cultivo	9
4.1.2. Caracteres biológicos	10
4.2. <i>Aeromonas hydrophila</i>: características y patogenicidad	11
4.2.1. <i>Aeromonas hydrophila</i>	11
4.3. Epidemiología	11
4.3.1. Patogenia	12
4.3.2. Definición de Septicemia por <i>Aeromonas</i> móviles	12
4.3.3. Signos clínicos	12
4.3.4. Anatomía Patológica:	13
4.4. <i>Aeromonas hydrophila</i> en esturión	13
4.5. Zoonosis	13
4.6. Control de la enfermedad	13
5. HIPÓTESIS	14
6. OBJETIVOS:	14
6.1. Objetivo general:	14
6.2. Objetivos específicos:	14
7. MATERIALES Y MÉTODOS	15
7.1. Origen y Mantenimiento de los peces	15
7.2. Confección del inóculo:	16
7.3. Infección experimental:	16
7.4. Registro de signos clínicos y muestreo de los animales	16
7.5. Conteo diferencial de leucocitos	17
7.6. Análisis estadístico	17

8- RESULTADOS	18
8.1. Signos clínicos.....	18
8.2. Hematología	19
8.3. Hallazgos de necropsia.....	20
9. DISCUSIÓN	21
9.1. Sintomatología Clínica	21
9.2. Hematología	22
9.3. Necropsia.....	23
10. CONCLUSIONES.....	24
11. BIBLIOGRAFÍA	25

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Caracteres morfológicos del <i>Acipenser baerii</i>	10
Figura 2: Alojamiento de los peces.	16
Figura 3: Elaboración de frotis sanguíneo	18
Figura 4: Hematología	21
Figura 5: Necropsia	22

LISTA DE CUADROS

	Página
Tabla 1: Sintomatología Clínica de esturión siberiano (<i>Acipenser baerii</i>) infectados experimentalmente con <i>Aeromonas hydrophila</i> . Frecuencia de observación de cada signo en porcentaje	20
Tabla 2: Recuento leucocitario de esturión siberiano (<i>Acipenser baerii</i>) infectados experimentalmente con <i>Aeromonas hydrophila</i> . Porcentaje del número de células	21
Tabla 3: Hallazgos de Necropsia	23

1. RESUMEN

La acuicultura es el cultivo de especies acuáticas bajo condiciones controladas y con fines principalmente comerciales. Capitales privados realizaron inversiones para el cultivo de esturiones en nuestro país. La cría intensiva de esturiones, comenzó a aumentar la incidencia de enfermedades. Debido a que el período de las hembras de esturión para la producción de caviar es de siete años en promedio, cualquier problema infeccioso que provoque muerte, retraso de crecimiento y madurez en las hembras genera pérdidas económicas en la producción tanto de caviar como de carne. *Aeromonas hydrophila*, bacteria Gram negativa, móvil, de distribución cosmopolita, es parte de la flora normal del intestino de los peces y puede actuar a su vez como patógeno oportunistas. La vía de transmisión es horizontal, por descargas gastrointestinales o lesiones en la piel. La Septicemia por *Aeromonas* móviles es una de las patologías bacterianas más importantes para la piscicultura de agua dulce tanto a nivel nacional como mundial. El objetivo general de ésta tesis fue caracterizar el cuadro clínico y patológico desarrollado por esturiones siberianos (*Acipenser baerii*) infectados experimentalmente con *A. hydrophila* por vía intraperitoneal. A partir de la observación periódica de los signos clínicos y la realización de conteo diferencial de leucocitos y necropsias a diferentes momentos posinfección (24, 48 y 72 horas), se determinaron las características principales de la patología desarrollada por los animales infectados experimentalmente. Aletas replegadas fue el primer signo clínico expresado por los animales infectados (48 horas posinfección), posteriormente (72 horas) se observaron los signos congestión de escudetes y ano hemorrágico. Las alteraciones en el leucograma diferencial se aprecian a partir de las 72 horas posinfección y se caracterizan por un descenso en el número de linfocitos y basófilos acompañado por un aumento en el número de monocitos y neutrófilos circulantes. Los hallazgos de necropsia más característicos de la infección experimental con *Aeromonas hydrophila* en *Acipenser baerii* por vía intraperitoneal son: bazo, hígado, branquias y ano congestivos, junto con estomago con alimento.

2. SUMMARY

Aquaculture is the culture of aquatic species under controlled conditions and with primarily commercial purposes. Private capitals had made investments for the sturgeon's culture in our country. Intensive sturgeon farming began to increase the incidence of diseases. Because the period for caviar production by sturgeon females is seven years on average, any infectious problem that causes death or stunting in maturity in females generates economic losses in both caviar and meat production. *Aeromonas hydrophila*, a motile Gram negative bacteria, of cosmopolitan distribution, is part of the normal flora of the fish intestine and can act as opportunistic pathogen. The route of transmission is horizontal, by gastrointestinal discharges or skin lesions. Motile *Aeromonas* septicemia is one of the most important bacterial pathologies for freshwater fish farming both nationally and globally. The general objective of this thesis was to characterize the clinical and pathological frame developed by siberian sturgeons (*Acipenser baerii*) experimentally infected with *A. hydrophila* intraperitoneally. From the periodic observation of the clinical signs and the differential counting of leukocytes and necropsies at different postinfection moments (24, 48 and 72 hours), the main characteristics of the pathology developed by experimentally infected animals were determined. Retracted flaps were the first clinical signs expressed by infected animals (48 hours postinfection); later (72 hours) the signs congestion of scales and hemorrhagic anus were observed. Alterations in differential leukogram are seen after 72 hours postinfection and are characterized by a decrease in the number of lymphocytes and basophils accompanied by an increase in the number of circulating monocytes and neutrophils. The most characteristic necropsy findings of the experimental infection with *Aeromonas hydrophila* in *Acipenser baerii* by intraperitoneal route are: spleen, liver, gills and anus congestive, together with stomach with food.

3. INTRODUCCIÓN

Chang planteó la siguiente definición de acuicultura: es el cultivo de especies acuáticas, deseables, bajo condiciones controladas, para el beneficio ecológico, económico y social (Huet, 1983).

La acuicultura en Uruguay tuvo sus orígenes entre los años 1922 y 1957, como explotación extensiva, con la introducción del pejerrey (*Odenthestes bonariensis*) (FAO, 1974).

En los últimos años capitales privados han incursionado en el cultivo de esturiones *Acipenser baerii* (esturión siberiano) y *Acipenser gueldenstaedtii* (esturión ruso) (Carnevia, 2008).

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1. Esturión Siberiano (*Acipenser baerii*)

4.1.1. Antecedentes históricos sobre su cultivo

A partir del año 1970 en la ex URSS se comenzó con los primeros pasos de su cultivo, hoy en día se presenta con una gran distribución, siendo explotado por muchos países (FAO, 2006).

El cultivo de esturión siberiano (*A. baerii*) en particular, tiene una gran popularidad en Europa, debido a que los animales son valiosos para los dos productos: carne de buen gusto y sin hueso y el caviar negro. El principal problema en la acuicultura de esturión es un largo período de maduración sexual (Fopp-Bayat y col., 2012).

En nuestro país, la producción de esturiones se inició en el año 1995; En la actualidad son dos las empresas que están instaladas: Esturiones del Río Negro (ERN) en Rincón de Baygorria (departamento de Durazno) y Estuario del Plata en San Gregorio del Polanco (departamento de Tacuarembó), todas ellas están ubicadas en embalses artificiales del Río Negro sobre represas hidroeléctricas (Bertullo y col, 2008).

4.1.2. Caracteres biológicos

Los esturiones son peces actinopteriños pertenecientes al orden Acipenseriformes. Estos animales primitivos poseen un esqueleto poco calcificado y presentan placas dérmicas formando cordones (dorsales y laterales) en lugar de escamas. En líneas generales podría decirse que los esturiones se caracterizan por presentar espiráculos, hocico y pedúnculo subcónicos, boca transversal, labio inferior truncado en el centro, barbillas suaves o ligeramente fibrosas y aleta caudal asimétrica. Al ser una especie rústica presenta la facilidad de adaptarse tanto a ríos como a mares. Presentando también amplia resistencia térmica, dependiendo de la especie (FAO, 2006; Carnevia, 2008).

En la Figura 1 se muestran los principales caracteres morfológicos del esturión siberiano (*Acipenser baerii*).

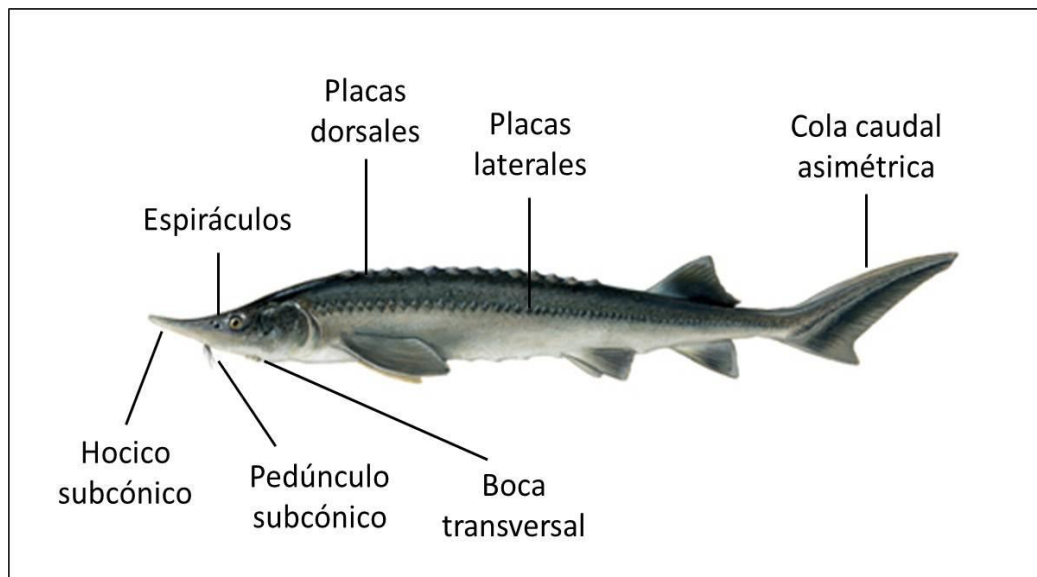


Figura 1: Caracteres morfológicos de *Acipenser baerii*

(tomado de: <http://www.delpescador.com.ar/foro/forum>)

4.2. *Aeromonas hydrophila*: características y patogenicidad

4.2.1. *Aeromonas hydrophila*

Integra la familia Aeromonadaceae, es un bacilo Gram -, móvil, no capsulado y no esporulado, anaerobio facultativo, con una temperatura óptima de crecimiento que va de 28 a 31°C. Las colonias son redondas y convexas con bordes bien delimitados; presentan 0,3 a 1mm de diámetro (Aoki, 1999).

4.3. Epidemiología

A. hydrophila afecta a muchas especies entre las que se encuentran principalmente los peces, también afecta a los anfibios, reptiles y mamíferos, inclusive al hombre; se puede encontrar en altas concentraciones en agua dulce, en sustratos ricos en materia orgánica, habiendo un incremento de su presentación en los meses calurosos (Pastor, 1981; Aoki, 1999; Janda, 2010).

Es parte de la flora normal intestinal de los peces. También puede ser aislada del agua y sedimentos de estanques. Al ser patógenos oportunistas, ejercen su acción cuando se presentan alteraciones en el medio, tales como estrés, hacinamiento y cambios bruscos de temperatura; estos factores ambientales debilitan la inmunidad de los peces, haciéndolos más susceptibles a la acción de este patógeno (Carnevia y col., 2010; Aoki, 1999).

Esta enfermedad infecciosa puede presentar una alta mortalidad y morbilidad (Carnevia y col., 2010)

La vía de transmisión en los peces es horizontal, por descargas gastrointestinales o lesiones externas de la piel. El contagio por vía respiratoria no está descrito y no se transmite de forma vertical (Aoki, 1999; Pastor, 1981).

El desarrollo de inmunidad por parte de los peces infectados con *A. hydrophila* se ve dificultado debido a la variedad antigénica que presenta ésta bacteria (Pastor, 1981).

Entre los factores por los cuales *A. hydrophila* puede desencadenar una enfermedad se encuentran los problemas de calidad del agua de cultivo y las condiciones de estrés que puedan ocurrir durante la cría de los peces (Inglis y col., 1993).

El desarrollo de un cuadro clínico a partir de una infección primaria por *Aeromonas hydrophila* es debido generalmente de una inmunosupresión atribuida a factores estresantes (temperatura, calidad del agua) lo que genera un aumento de la proliferación bacteriana con una rápida septicemia hemorrágica. Este patógeno es capaz de provocar infecciones secundarias en animales previamente parasitados o afectados por una patología viral (entre otros factores) (Van Impe, 1977, Humphrey, 1985, Leung y col., 1995).

Se ha demostrado que esta enfermedad afecta tanto a peces de aguas templadas como tropicales. Presentando la misma patogenia en estos dos ambientes diferentes (Swann y White, 1989).

4.3.1. Patogenia

El género *Aeromonas* presenta una patogenia variable. En la forma intestinal generan metabolitos tóxicos, los cuales son absorbidos en la luz intestinal, se diseminan y desencadenan toxemia. Como factores de virulencia podemos encontrar al lipopolisacárido (LPS), productos extracelulares (ECP), sideróforos, proteínas de superficie, hemolisinas, proteasas, hemoaglutininas y acetilcolinesterasa, entre otros (Thune y col., 1986; Allen y col., 1983; Boulanger y col., 1977).

4.3.2. Definición de Septicemia por *Aeromonas* móviles

Es una enfermedad infecto contagiosa que se disemina por el torrente sanguíneo llegando a todos los órganos, dando lugar a una trombocitopenia generando un síndrome hemorrágico. Las especies más representativas del grupo son: *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae* y *A. veroni* (Nemetz, 1993; Pastor, 1981).

A lo largo del tiempo la enfermedad fue adquiriendo distintas sinonimias tales como Peste roja, Septicemia hemorrágica, Ascitis infecciosa, relacionadas con la sintomatología de la enfermedad (Amlacher, 1964).

4.3.3. Signos clínicos

Forma sobreaguda: en este tipo de presentación de la enfermedad es muy difícil ver los signos clínicos, lleva rápidamente a la muerte del animal (Carnevia, 1993; Carnevia y col., 2010).

Forma aguda típica: se puede ver al animal con cuadros de ascitis, úlceras, necrosis de las aletas, prolapso anal, exoftalmía, branquias congestivas, aletas replegadas. (Inglis y col., 1993; Carnevia 1993; Carnevia y col., 2010; Amlacher, 1964).

Forma ulcerosa crónica: presenta una incidencia estacional a fines de primavera e inicios de verano, debido al aumento de temperatura hay un aumento en la patogenia de la bacteria permitiendo a aquellas bacterias que estaban latentes en el pez ejercer su patogenia generando úlceras en piel y músculo (Carnevia, 1993; Carnevia y col., 2010).

Forma latente: los peces actúan como reservorio de la enfermedad (Carnevia y col., 2010).

4.3.4. Anatomía Patológica:

La enfermedad se presenta con hemorragias en la base de las aletas y órganos internos, palidez e hígado moteado, ascitis y líquido sanguinolento en el intestino. En ocasiones se puede observar hepatomegalia en animales infectados. (Inglis y col.,1993).

La característica principal de la necropsia es hiperemia de las vísceras con hemorragias en mesenterio y peritoneo, pueden presentarse adherencias de fibrina. Esplenomegalia, riñón aumentado de tamaño a menudo puede presentarse licuefacto y necrosado (Inglis y col ,1993).

4.4. *Aeromonas hydrophila* en esturión

En el año 2009 hubo un brote de septicemia hemorrágica causada por *Aeromonas* spp., en Shanxi (China), con una mortalidad del 15%, los peces presentaron pérdida de la condición corporal, úlceras en la piel, inflamación y hemorragia generalizada en hígado, riñón, a nivel gastrointestinal y en branquias, degeneración del epitelio, necrosis gástrica (Zhao y col., 2009).

4.5. Zoonosis

Las bacterias de la flia. Aeromonadaceae pueden generar en el hombre infecciones tanto intestinales como extra intestinales, la forma más común de infectarse es a través del agua y alimentos contaminada con la bacteria *A. hydrophila*. Si esa persona esta inmunocomprometida además de generar alteraciones digestivas, se podría llegar a desencadenar una septicemia y/ o peritonitis (Janda, 2010; Castro y col, 2003).

4.6. Control de la enfermedad

La principal medida para prevenir esta enfermedad es la de mantener una adecuada higiene del agua, el secado de los estanques y una buena alimentación; *A. hydrophila* presenta sensibilidad a determinados antibióticos como a las tetraciclinas, sulfonamidas y florfenicol. La forma más común de administrar los fármacos en piscicultura es mediante los alimentos; siendo la vía inyección intramuscular menos frecuente, debido a que las fibras musculares de los peces oponen una gran resistencia a la hora de suministrar el fármaco, provocando lesiones a nivel de los músculos y provocando altos niveles de estrés a los animales (Aoki, 1999).

5. HIPÓTESIS

Acipenser baerii infectados experimentalmente por vía intraperitoneal con *Aeromonas hydrophila* desarrollarán el cuadro de Septicemia por *Aeromonas* móviles

6. OBJETIVOS:

6.1. Objetivo general:

Caracterizar el cuadro clínico y patológico desarrollado en *Acipenser baerii* a partir de la infección experimental con *Aeromonas hydrophila*.

6.2. Objetivos específicos:

6.2.1 Describir el cuadro clínico de los animales infectados experimentalmente mediante el registro periódico de los síntomas desarrollados por los peces.

6.2.2 Caracterizar el leucograma diferencial de los animales infectados experimentalmente en distintos instantes pos infección.

6.2.3. Describir las lesiones macroscópicas observadas a la necropsia de los peces infectados experimentalmente.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Se determinó el efecto de la infección con *Aeromonas hydrophila* sobre la expresión de signos clínicos y el recuento diferencial de leucocitos en juveniles de esturión siberiano (*Acipenser baerii*), 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 un aislamiento de ésta bacteria obtenido de una epizootia de SAM en una piscicultura comercial. A las 24, 48 y 72 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.

7.1. Origen y Mantenimiento de los peces

Se emplearon 30 juveniles de *Acipenser baerii* (200 a 300 gramos) procedentes del establecimiento Esturiones del Río Negro. Los animales se repartieron al azar en seis grupos de cinco peces. Cada grupo se alojó en un acuario de vidrio de 100 litros de volumen, con filtración biológico-mecánica y temperatura constante de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$.

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 suministro alimento (*pellet* flotante) una vez al día para evaluar la presencia/ausencia de anorexia como síntoma asociado a la infección (el alimento se retiró luego de evaluado el apetito de los animales).



Figura 2: Alojamiento de los grupos de esturiones siberianos (*Acipenser baerii*) empleados para las experiencias de infección experimental con *Aeromonas hydrophila*

7.2. Confección del inóculo:

El inóculo consistió en una suspensión de bacterias vivas en PBS estéril. Para ello se tomó un cultivo puro de bacterias con 24 horas de crecimiento realizado en caldo BHI, el mismo se centrifugó a 3600 rpm durante 30 minutos y con el *pellet* resultante se realizó una re suspensión en PBS estéril hasta obtener una turbidez equivalente a la absorbancia deseada (Perretta, 2016).

En estudios previos se determinó para éste aislamiento de *Aeromonas hydrophila*, la concentración bacteriana capaz de inducir la muerte en el 50% de una población de peces, dentro de las 96 horas posteriores a la infección experimental (dosis letal 50 - 96 horas: DL50₉₆). Dicha DL50₉₆ es $9,3 \times 10^8$ ufc.mL⁻¹, equivalente a una absorbancia de 1,4 a 600 nm de longitud de onda.

7.3. Infección experimental:

A los peces de cuatro de los grupos experimentales (n=20) se les inyectó por vía intraperitoneal un volumen de 10 µL por gramo de peso vivo del inóculo bacteriano descrito previamente. Los dos grupos restantes (n=10) se tomaron como control y fueron inyectados 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).

7.4. Registro de signos clínicos y muestreo 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 seis minutos por individuo a las 24, 48 y 72 horas posinfección (PI). 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.

A las 24, 30, 48 y 72 horas posinfección se sacrificó un animal de cada uno de los grupos con la finalidad de obtener datos de necropsia y extraer sangre para realizar frotis.

El sacrificio se llevó a cabo 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 punción de la vena caudal y colecta con jeringa de 1 mL.

7.5. 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 a 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. 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.



Figura 3: Proceso de elaboración de frotis sanguíneo.

7.6. Análisis estadístico

Se determinó la significancia estadística de las diferencias observadas en la frecuencia de signos clínicos a diferentes horas posinfección y con respecto al grupo control mediante el test estadístico de Kruskal-Wallis. Del mismo modo se procedió para determinar las diferencias observadas en las frecuencias de conteo de cada uno de los grupos celulares evaluados. Para llevar a cabo ambos análisis se empleó el *software* Statgraphics Centurion XVI Versión 16.1.18 de StatPoint Technologies, con un nivel de confianza mínimo del 95%.

8- RESULTADOS

8.1. Signos clínicos

En la Tabla 1 se presentan los resultados del análisis de los signos clínicos presentados en los animales infectados experimentalmente.

Nótese que la mayoría de los signos clínicos se expresan a partir de las 72 horas post infección.

Tabla 1: Sintomatología clínica de esturión siberiano (*Acipenser baerii*) infectados experimentalmente con *Aeromonas hydrophila*. Frecuencia de observación de cada signo en porcentaje.

	Horas posinfección (Hs PI)				Estadística
	24	48	72	Control (24 a 72 Hs PI)	
Aletas replegadas	0 ^a	17,4 ^b	12,5 ^b	0 ^a	KW: 15,2; p<0,05
Ano hemorrágico	0 ^a	0 ^a	13,1 ^b	0 ^a	KW: 18,5; p<0,01
Ascitis	0	6,5	5,3	0	KW: 7,6; p=0,05
Cambio de coloración	6,5	0	5,3	0	KW: 7,6; p=0,05
Escudetes congestivos	0 ^a	0 ^a	10,5 ^b	0 ^a	KW: 12,2; p<0,01
Letargia	0	0	5,3	0	KW: 6,0; p=0,11

KW: estadístico Kruskal-Wallis. a#b con p≤0,05

8.2. Hematología

En la Tabla 2 se presentan los resultados correspondientes al leucograma diferencial llevado a cabo sobre los peces infectados y controles.

Tabla 2: Recuento leucocitario de esturión siberiano (*Acipenser baeri*) infectados experimentalmente con *Aeromonas hydrophila*. Porcentaje del número de células.

	Horas posinfección (Hs PI)				Control (24 a 72 Hs PI)	Estadística
	24	30	48	72		
Linfocitos	41,2±5,1 ^a	44,8±3,3 ^a	41,6±4,9 ^a	22,5±4,2 ^b	40,3±4,2 ^a	KW: 13,0; p<0,05
Neutrófilos	41,2±3,1 ^a	43,4±2,7 ^a	42,4±3,3 ^a	61,3±2,4 ^b	40,8±1,8 ^a	KW: 11,1 p<0,05
Basófilos	9,4±1,0 ^a	6,6±0,8 ^a	5,8±1,1 ^a	0 ^b	6,6±0,3 ^a	KW: 28,1; p<<0,01
Eosinófilos	8,1±2,1	10,1±1,9	9,3±1,5	7,8±3,1	11,0±2,8	KW: 3,7; p=0,5
Monocitos	0 ^a	0 ^a	0,3±0,2 ^a	1,5±0,4 ^b	0 ^a	KW: 11,4; p<0,05

KW: estadístico Kruskal-Wallis. ^{a≠b} con p≤0,05

Nótese que, también para ésta técnica se aprecian diferencias únicamente a las 72 horas post infección, destacándose una disminución de los linfocitos y basófilos con aumento en el nivel de neutrófilos y monocitos.

En la Figura 4 se muestran ejemplos de los principales tipos de células sanguíneas que se pueden observar en esturiones siberianos

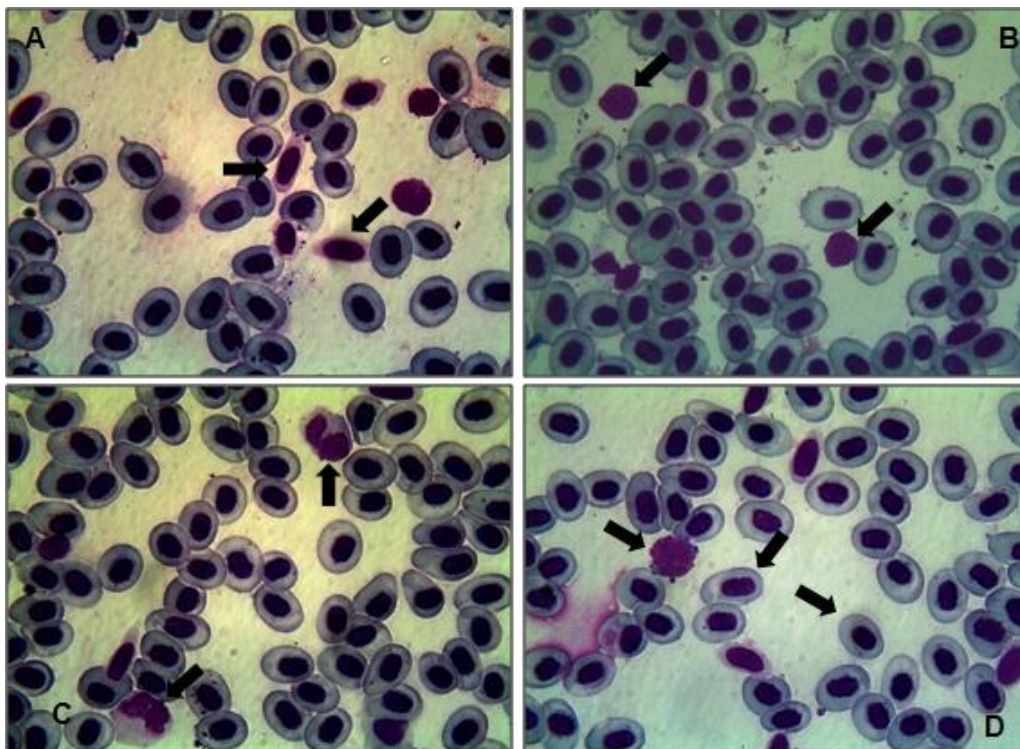


Figura 4: Aspecto microscópico del frotis sanguíneo 1000x, tinción de Giemsa. Figura A, trombocitos; Figura B, linfocitos; Figura C, neutrófilos; Figura D, eritrocitos y granulocito.

8.3. Hallazgos de necropsia

En la Tabla 3 se presentan los principales hallazgos macroscópicos realizados a la necropsia de los esturiones infectados experimentalmente

Tabla 3: Hallazgos de necropsia en esturiones siberianos (*Acipenser baerii*) infectados experimentalmente con *Aeromonas hydrophila*

Hallazgo de necropsia	Frecuencia (%)
Bazo congestivo	88,9
Hígado congestivo	66,7
Branquias congestivas	66,7
Estomago con alimento	55,6
Ano congestivo	55,6
Mucosa estomacal congestiva	44,4
Gas en tubo digestivo	22,2
Mucosa tubo digestivo congestiva	22,2
Aletas congestivas	22,2
Estomago con contenido líquido	11,1
Digestivo con contenido sanguinolento	11,1

Nótese que los hallazgos más representativos corresponden a procesos congestivos en distintos órganos.



Figura 5: Necropsia

9. DISCUSIÓN

9.1. Sintomatología Clínica

Existen pocas investigaciones en las que se describan los signos clínicos desarrollados por peces infectados experimentalmente con *Aeromonas* spp., siendo el esturión una especie para la que aún no se ha generado este tipo de información. Debido a esto, los aspectos comparativos entre nuestros hallazgos y los realizados por otros investigadores se ven dificultados.

Un aspecto a destacar de nuestra experimentación, es el hecho de que los signos clínicos en esturiones infectados experimentalmente con *A. hydrophila* son escasos y se observan fundamentalmente a partir de las 72 horas posinfección. Siendo aletas replegadas el único signo comportamental apreciado en estos peces, observable a partir de las 48 horas posinfección con una frecuencia más elevada a la observada en el grupo control.

A pesar de esto, varios signos comportamentales, tales como letargia y anorexia, han sido descritos por otros autores (Plumb y Hanson, 2011; Carnevia y col., 2010) como característicos de SAM y no se vieron presentes en los esturiones de éste estudio, lo que podría estar indicando, una respuesta particular de ésta especie ante la infección experimental con *A. hydrophila*.

La ausencia de anorexia en los esturiones infectados es un factor a destacar, dado que permitiría la implementación de tratamientos orales en animales infectados como opción para el control de brotes de SAM en establecimientos productivos.

Los signos ano hemorrágico y escudetes congestivos, si bien se presentan en baja frecuencia, permiten evidenciar la instalación de un proceso hemodinámico en los peces con alteraciones sistémicas de gravedad, tales como la hemorragia y descamación del epitelio del tubo digestivo, hallazgos comunes realizados por otros autores en tilapias infectadas experimentalmente con *A. hydrophila* (Rey y col., 2009)

9.2. Hematología

Dada la gran diversidad morfológica que presentan las células sanguíneas entre las distintas especies de peces, es difícil la clasificación general de leucocitos, presentándose gran diferencia en forma y tamaño según las diferentes etapas de desarrollo celular, lo que dificulta la estandarización de valores hemáticos entre especies (Zexia y col ,2007).

Al igual que lo ocurrido con los signos clínicos, las alteraciones en el leucograma diferencial se aprecian fundamentalmente a partir de las 72 horas post infección, caracterizándose por un descenso de los linfocitos y un aumento de los neutrófilos y monocitos circulantes, en comparación con lo ocurrido en el grupo control. En nuestro caso, al igual de lo que ocurre en otras investigaciones, las alteración hematológica coincide en el tiempo con la aparición de la sintomatología clínica en los peces infectados (Knowles, 2006), lo que podría estar indicando la validez de ésta técnica paraclínica para establecer el estado de salud de los animales

La disminución en el número de linfocitos circulantes en los animales infectados experimentalmente puede atribuirse a la afinidad de *Aeromonas hydrophila* por este tipo celular, provocando la lisis de los mismos (Aoki, 1999)

El aumento en neutrofilos y monocitos a las 72 horas post infección podría ser adjudicado a que el proceso infeccioso desarrollado por *Aeromonas hydrophila* tardo en generalizarse a nivel sistémico observándose un reclutamiento de células fagocíticas para disminuir la carga bacteriana y de detritos en el animal infectado (Olabuenaga,2000)

9.3. Necropsia

Nuestros hallazgos de necropsia fueron similares a los realizados por Vasquez-Piñeros y col. (2010), en infecciones experimentales en tilapias, pudiéndose observar congestión generalizada en la mayoría de los órganos estudiados a la necropsia

Los hallazgos de necropsia con los que nos encontramos más frecuentemente (bazo, hígado y branquias congestivas entre otros) coinciden con los realizados por otros autores (Zepeda, 2015) a partir de la infección experimental con *Aeromonas hydrophila* por vía intramuscular en trucha arcoíris.

La ausencia de anorexia como signo clínico en los esturiones infectados experimentalmente se vio reflejada a su vez en la necropsia, dado que un elevado porcentaje de animales tratados presentaron contenido en el estómago. Estos hallazgos son contrarios a los realizados por otros investigadores, quienes encuentran estómago sin contenido o con sangre en animales infectados experimentalmente con ésta bacteria (Zepeda, 2015).

Entre los hallazgos realizados por otros autores a partir de la infección experimental por *A. hydrophila* en peces se citan lesiones en el sitio de inoculación de la bacteria tales como necrosis muscular (Zepeda, 2015), lo que no coincide con lo ocurrido en *A. baerij*, dado que no se observaron alteraciones en el sitio de inoculación.

La esplenomegalia y congestión de las branquias fueron una de las alteraciones de mayor relevancia en nuestra experimentación, debido a que se presentaron con una elevada frecuencia en los esturiones infectados. Esta alteración a nivel del bazo podría explicar también el descenso de los linfocitos a las 72 horas post infección, dado que este órgano funciona como un órgano linfoide secundario para la capacitación de los linfocitos (Barbuio, 2013)

10. CONCLUSIONES

Es posible reproducir un cuadro clínico y patológico compatible con la Septicemia por aeromonadales móviles en esturiones siberianos (*Acipenser baerii*) a partir de la infección experimental de *Aeromonas hydrophila* por vía intraperitoneal.

Aletas congestivas es el único signo clínico comportamental expresado por los peces infectados, el mismo se observa a partir de las 48 horas posinfección. El resto de los signos clínicos identificables para ésta especie de peces luego de la infección experimental con *Aeromonas hydrophila* son congestión de escudetes y ano hemorrágico.

Las alteraciones en el leucograma diferencial se aprecian a partir de las 72 horas posinfección y se caracterizan por un descenso en el número de linfocitos y basófilos acompañado por un aumento en el número de monocitos y neutrófilos circulantes.

Los hallazgos de necropsia más característicos de la infección experimental con *Aeromonas hydrophila* en *Acipenser baerii* por vía intraperitoneal son: bazo, hígado, branquias y ano congestivos, junto con estomago con alimento.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Aoki T (1999). Motile Aeromonads (*Aeromonas hydrophila*). Fish Diseases and Disorder.3:347-453.
2. Amlacher, E (1964). Manual de Enfermedades de los peces. Zaragoza. Acribia.319p.
3. Barbuio,R (2013). Hematología e Histopatología de Tilapias Vacinas e desafiada com *Aeromona hydrophila* e *Streptococcus agalactiae*.Agalactiae. Tesis, Faculta: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – Jaboticabal, 46p.
4. Bertullo,E.;Campot,J.;Fernandez,S.;Gomez,F.;Pollak,A(2008).Technological Develoment of smoked meat of sturgeon (*Acipenser spp*). Montevideo.Revista Brasileira Engenharia de Pesca. 3(2).p56.
5. Carnevia, D (1993). Enfermedades de los peces Ornamentales. Montevideo. Arg. agrovet.p.319.
6. Carnevia, D (2008). Análisis de las oportunidades de cultivo en especies acuáticas del Uruguay. Montevideo,Dinara-FAO.68 p.
7. Carnevia, D; Letamendia, M; Perretta, A; , Delgado, E.(2010). Caracterización de la Septicemia Hemorrágica Bacteriana (SBH) ,diagnosticada en peces ornamentales de Uruguay. Veterinaria Montevideo.46:27-32.
8. Castro.G.;Hernandez.MG.;Silva.GC(2002) El genero *Aeromonas* un patógeno importante en Mexico. En Ynfec Microloiol22/4):206-216. Disponible en: [www.pdf](#). Fecha de consulta: 9/9/15
9. Castro,G,Agulera,M.G,Hernandez,C.H,ArteagaR.I,Carmona AA.;PerezA,Giono S, Cerezo,Figueras M.J.;Aparicio G(2003). La Identificación genética de *Aeromonas*, una realidad y una necesidad para la microbiología diagnostica. Bioquimica.Mexico.28:11-28
10. FAO (1974).La acuicultura en América Latina .Simposio sobre Acuicultura en America Latina,Montevideo,Uruguay.Disponible en <http://www.fao.org/docrep/005/AC867S/AC867S00.htm>.8/10/14

11. FAO(2005).Programa de información de especies acuáticas.Acispencer Baerii.Disponible en: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Acipenser_baerii/es.12/12/13
12. Fopp-Bayat,D .; Wlasow,T, .; Ziomek,E (2013). Haematology of gynogenetic diploids of Siberian sturgeon *Acipenser baerii* Brandt. *Acta Veterinaria Brno*.82:81-85.
13. Hedrick, R.; la Patra, S.;Mc Dowell,T.;Mac Connell,B.(2001).A workshop on sturgeon Diseases.4th Int Symp Sturgeon.8-13 julio 2001, Oshkosh, WI,USA.
14. Disponible en : http://www.delpescador.com.ar/foro/forum_posts.asp?TID=15919. 13/08/2015.
15. Hahn-Von-Hessberg.C.;Grajales-Quintero.A.;Gutierrez-Jaramillo.A (2011) .Parametros hematológicos de Tilapida nilotica (*Oreochromis niloticus*,Linacus1757) con peso de entre 250 y 350g, en el centro Experimental Piscicola de la Universidad de coldas. *Vet zootec* 5 (1):47-61.
16. Huet,M.(1983).Tratado de piscicultura .Madrid,Mundi Prensa,753p.
17. Inglis,V.; Roberts,R.J y Bromage.R(1993).Bacterial Diseases of Fish. London. Wiley-Blackwell.336.p
18. Janda,M.J,Abott,S (2010). The genus *Aeromonas*: Taxonomy,pathogenecity,and Infection. Vol 23,N 1.Clinical Microbiology Reviews.23(1):35-74.
19. Knowles, Susan (2006).Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*).*Veterinary Clinical Pathology* 35(4):434-440. *International Medicine*.
20. Nemetz.T.G.:(1993).Zoonotic diseases in Fish Medicine. Mexico.W.BSaunders Company,318p.
21. Olabuenaga.S.E(2002)Fish Inmune System.(2002).Sistema Inmune en peces.*Guayana* 64(2)
22. Pastor,E.Z.(1981).Principales enfermedades infecciosas de los peces. En Barcelona.Aedos.175p.

23. YuanYuan,L.;Haiping,C.;Lu,D.;Le Xion ,Y(2008).Isolation of pathogenic bacteria *Aeromona Hydrophila Acispenser baerii* and immune effects of its whole cell vaccine.China Boon of Chinese Journald of zoology.43(6):1-9.
24. You Sheng,J.;Qian,Y.;L.;(2012).The immunocross reaction between pathogenic *Aeromonas Hydrophila* isolated Siberian sturgeon *Acispenser baerii* and other there *Aeromonas* straisn.China.(29)1.Jornal of Biology 30-32p.
25. Vazques-Piñeros.(2010)Estudio clínico y hematológico de una infección experimental con *Aeromona hydrophila* y *Edwardsiella tarda* en tilapia,*Oreochromi sp.*Orinoquia 14(1):33-44.
26. Zhao,F.;Cao,J.;Liu,Q(2009).Study on pathology and etiology of hemorrhagic septicemic in *Acispenser baerii* .*Acta Hydrobiologia Sinica*.33(2).316-323p.
27. Z.Kabata(1985).Parasites and diseases of fish cultured in the tropics. Taylor y Francis.London,Taylor,318p.
28. Zepeda – Velazque.a.(2015)La infección en la trucha arcoiris (*Orchinchus mysiss*) y su aislamiento en mexico. *Aqua TIC*.42:1-16.
29. Zexia, G.; Weimon, W.; James, D. (2007). Morphological studios of peripheral blood cells of the Chinense sturgeon, *Acipenser sinensis*.33:213-222.