

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y RESPUESTA LEUCOCITARIA DE LA
CASTAÑETA (*Australoheros facetus*) AL DESAFIO EXPERIMENTAL CON
Aeromonas hydrophila.**

Por

**LOMBARDO Rodrigo
NUÑEZ Micaela**

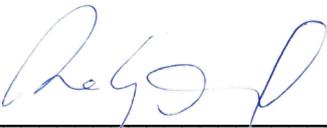
TESIS DE GRADO presentada como
uno de los requisitos para obtener el
título de Doctor en Ciencias
Veterinarias.

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

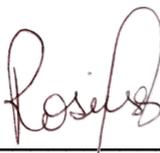
MODALIDAD: Ensayo Experimental
Tutor: Dr. Alejandro Perretta

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2021**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Presidente de mesa: 
_____ **Dr. Rodrigo Puentes**

Segundo miembro (Tutor): 
_____ **Dr. Alejandro Perretta**

Tercer miembro: 
_____ **Dra. Rosina Sánchez**

Fecha: 28/07/2021

Autores: 
_____ **Br. Micaela Nuñez**


_____ **Br. Rodrigo Lombardo**

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer en primer lugar a nuestro tutor el Dr. Alejandro Perretta por su gran trabajo, buena disposición y enorme paciencia. Dedicó mucho de su tiempo y compartió conocimientos que nos ayudaron a elaborar esta tesis.

A la facultad de Veterinaria (UDELAR) y a todos los compañeros y compañeras del Instituto de Investigaciones Pesqueras, en especial al Área Acuicultura y Patología de Organismos Acuáticos y a su encargado de Área el Dr. Daniel Carnevia por su amabilidad y generosidad.

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

A los amigos y amigas de facultad con los cuales hemos compartido un montón de vivencias juntos durante tantos años.

A todos los amigos y amigas de la vida.

Muchas gracias.

Tabla de contenido

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
Lista de tablas y figuras	5
RESUMEN	6
SUMMARY	7
1.INTRODUCCIÓN	8
1.1 Generalidades sobre acuicultura	8
1.2 Características de las castañetas (<i>Australoheros facetus</i>) y su uso en acuicultura	9
1.3 Enfermedades bacterianas en peces de acuicultura	9
1.4 Importancia de <i>Aeromonas hydrophila</i> (Bacteria: Aeromonadaceae)	10
2. HIPÓTESIS	13
3. OBJETIVO GENERAL	13
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
4. MATERIALES Y MÉTODOS.	14
4.1 Origen de las bacterias y confección del inóculo	14
4.2 Desafío experimental	14
4.3 Conteo diferencial de leucocitos	14
4.4 Registro de signos clínicos y muestreo de animales	15
4.5 Análisis estadístico	15
5. Resultados	16
5.1 Leucograma diferencial	16
5.2 Signos clínicos	18
6. Discusión	20
7. Conclusiones	21
8.Bibliografía	22

Lista de tablas y figuras.

Tabla 1. Conteo diferencial de leucocitos de *Australoheros facetus* a diferentes días post-infección experimental (p.i.) con *Aeromonas hydrophila* (media \pm s).

Tabla 2. Signos clínicos expresados por *Australoheros facetus* a diferentes días post-infección experimental (p.i.) con *Aeromonas hydrophila* por vía intraperitoneal. El porcentaje indica el número de animales que expresaron cada uno de los signos.

Figura 1. Ejemplar de *Australoheros facetus* - (Foto Iván González-Bergonzon) (tomado de: Teixeira de Mello et al., 2011).

Figura 2. Microfotografía de frotis de sangre de *Australoheros facetus* en la que se observan eritrocitos (E), linfocitos (L) y neutrófilos inmaduros (N), (tinción de May Grunwald -Giemsa 1000X).

Figura 3. Microfotografía de frotis de sangre de *Australoheros facetus*. Se observan basófilos (B), eritrocitos (E), linfocitos (L) y neutrófilos, (tinción de May Grunwald -Giemsa 1000X).

Figura 4. Ejemplares de *Australoheros facetus* eutanasiados para toma de muestras momentos antes de realizar la necropsia. Puede apreciarse el abdomen distendido (AD) con zonas pálidas (ZP) y zonas congestivas (ZC) según el ejemplar, ano hemorrágico (AH), opérculos congestivos (OC) y exoftalmia (EX).

Gráfica 1. Representación gráfica de los resultados del leucograma diferencial.

Gráfica 2. Representación gráfica de los resultados de los signos clínicos.

RESUMEN

Australoheros facetus es un cíclido muy abundante en la cuenca del Río de La Plata, y las subcuencas de los ríos Paraná y Uruguay. Posee características que lo hacen candidato para el desarrollo de su tecnología de cultivo. *Aeromonas hydrophila*, por otro lado, es la bacteria más abundante en cuerpos de agua dulce y el patógeno oportunista más comúnmente aislado en las epizootias que ocurren en las pisciculturas dulceacuícolas de todo el mundo. A pesar de lo anterior, existe muy poca información acerca de la susceptibilidad de este pez a dicha bacteria y de los efectos de la misma sobre el estado de salud de los animales infectados. En este trabajo se evaluó el efecto que tiene el desafío experimental por vía intraperitoneal con esta bacteria sobre el recuento diferencial de leucocitos de *Australoheros facetus* en diferentes días post-desafío y sobre la expresión de signos clínicos. Se encontraron diferencias en el conteo diferencial de linfocitos (L) y neutrófilos (N) de los grupos desafiados (d) con respecto al grupo control (c) (L_d : $78,4 \pm 11,1\%$ vs. L_c : $55,5 \pm 4,2\%$, N_d : $19,6 \pm 2,3\%$ vs. N_c : $43,8 \pm 1,1\%$; $p < 0,05$), no existiendo diferencias en el número de basófilos ($1,1 \pm 0,6\%$), eosinófilos ($0,2 \pm 0,8\%$) y monocitos ($0,5 \pm 0,5\%$). Se observó una respuesta primaria ante la infección a predominio linfocitario y una disminución en el número de neutrófilos en respuesta al desafío, lo que podría estar indicando un proceso septicémico con excesivo consumo de células fagocíticas.

Palabras clave: Aeromoniasis, septicemia por *Aeromonas* móviles.

SUMMARY

Australoheros facetus is a cichlid widely distributed on the La Plata, Paraná and Uruguay Rivers basins. Its zootechnical characteristics makes them as a candidate for the development of its aquaculture technology. On the other hand, *Aeromonas hydrophila* is both the most common bacteria on freshwater environments and the most commonly freshwater bacterial pathogen in aquaculture all over the world. Regardless of the above mentioned, they exist few information about the susceptibility of this fish to this bacteria and on its effect on the health of challenged animals. We evaluate the effect of the experimental challenge with *Aeromonas hydrophila* on the *Australoheros facetus* leukocytes differential count and the clinical signs expressed. It was found differences on lymphocytes (L) and neutrophils (N) counting (challenged L: $78,4 \pm 11,1\%$ vs. control L: $55,5 \pm 4,2\%$, challenged N: $19,6 \pm 2,3\%$ vs. control N: $43,8 \pm 1,1\%$; $p < 0,05$), no differences on the basophils ($1,1 \pm 0,6\%$), eosinophils ($0,2 \pm 0,8\%$) and monocytes ($0,5 \pm 0,5\%$) numbers were found. A primary lymphocytic and neutrophilic response to the challenge was observed, so that it could be indicating a septicemic process with excessive phagocytic cells consumption.

Key words: Aeromoniasis, mobile *Aeromonas* septicemic.

1.INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades sobre acuicultura

El término acuicultura se define como el cultivo de organismos acuáticos en áreas continentales o costeras, que implica por un lado la intervención en el proceso de crianza para mejorar la producción y por el otro la propiedad individual o empresarial del stock cultivado (Uruguay. Plan nacional de desarrollo de la acuicultura 2008a).

En Uruguay, la acuicultura tiene su origen en el año 1910 cuando se realizó la siembra de alevinos de pejerrey provenientes de Argentina en la Laguna del Sauce, con el fin de repoblar dicho ambiente natural. Asimismo, a principios del siglo XX particulares realizaron intentos para implantar la acuicultura de trucha (*Oncorhynchus mykiss*) en Villa Serrana y mejillón (*Mytilus edulis platensis*) en La Paloma. Desde el año 1974 gracias a la creación del Departamento de Acuicultura dentro del INAPE (Instituto Nacional de Pesca), comienza una etapa más organizada donde se define al bagre negro (*Rhamdia quelen*) como especie prioritaria para la acuicultura, desarrollándose así la metodología de reproducción controlada, producción de semilla y engorde del mismo (Uruguay, 2008b).

El desarrollo de la acuicultura presenta una gran ventaja al criar especies de interés comercial para producir alimento sin la necesidad de extraerlo de su ambiente natural. Sin embargo, esta práctica ha ocasionado la extinción de especies autóctonas al realizarse con especies exóticas invasivas las cuales al escaparse proliferan en el ambiente provocando cambios en los ecosistemas (Teixeira de Mello, González-Bergonzoni & Loureiro, 2011).

En 2014 por primera vez la producción mundial de pescado destinado al consumo humano proveniente de la acuicultura superó al volumen del pescado capturado. (FAO, 2016).

Australoheros facetus, se puede utilizar como pez de laboratorio o como pez ornamental. Tiene varias características que la hacen candidata para el desarrollo de su tecnología de cultivo intensivo, como ser su fácil reproducción en cautiverio y su rápido crecimiento. En el Instituto de Investigaciones Pesqueras de la Facultad de Veterinaria (UdelaR) se encuentra el bioterio donde se desarrolla la producción y el crecimiento de esta especie para luego utilizarlos en diversos proyectos relacionados con la toxicología, la patología y el cultivo (Carnevia, 2017).

Por otro lado, la venta de peces ornamentales se ha integrado en los últimos años exitosamente a la profesión veterinaria. Los peces ornamentales son la tercera mascota más frecuente en Uruguay, donde se comercializan alrededor de 500.000 ejemplares por año, de los cuales alrededor de 350.000 son criados en el país (Carnevia, Rosso, Letamendia, Carnales, Perretta, 2013).

Tanto en criaderos como en comercios ocurren epizootias con elevada mortalidad, las cuales son mayoritariamente causadas por bacterias oportunistas, pudiendo causar zoonosis en algunos casos. (Carnevia, Letamendía, Perretta Delgado 2010).

1.2 Características de las castañetas (*Australoheros facetus*) y su uso en acuicultura

En el año 1833, en Maldonado, Uruguay, Charles Darwin (1809-1882) determinó 5 especies nuevas para la ciencia, de las cuales 4 se encontraron en la laguna del diario, dentro de estas aparece la castañeta (*Australoheros facetus*), (Calviño, 2007).

Australoheros facetus (figura 1), es un pez óseo perteneciente al orden Perciformes y a la familia Cichlidae, se la conoce vulgarmente como: castañeta, chanchita, acará o chata. Es una especie de tamaño mediano, cuerpo ovalado y comprimido que puede alcanzar los 25 cm de longitud. Habita en ambientes con mucha vegetación pudiéndose encontrar en cañadas, tajamares, lagunas, arroyos y ríos de todo el país, alimentándose de peces pequeños, plantas y algas adheridas a sustratos. Se reproduce en verano, la hembra deposita sobre superficies previamente acondicionadas de 300 a 1000 huevos. Al nacer las crías son guiadas y cuidadas ferozmente por sus padres durante las primeras 6-8 semanas de vida. Su distribución abarca la cuenca baja del Río Paraná en Argentina y la cuenca costera de Brasil y Uruguay (Serra et al., 2014).



Figura 1. Ejemplar de *Australoheros facetus* - (Foto Iván González-Bergonzon) (tomado de: Teixeira de Mello et al., 2011).

1.3 Enfermedades bacterianas en peces de acuicultura

Según Torroella (1988), el término enfermedad se refiere a cualquier desvío del estado normal de salud e incluye condiciones patológicas como el resultado de factores genéticos, fisiológicos, nutricionales, ambientales y la condición infecciosa causada por patógenos. En acuicultura, la progresión de la enfermedad con la consecuente muerte de las especies cultivadas se da en la mayoría de los casos por una combinación entre un agente infeccioso y el estrés ambiental.

En la piscicultura intensiva determinadas condiciones y factores de manejo estresantes como el transporte inadecuado, la sobrepoblación, variaciones bruscas de temperaturas, bajos niveles de oxígeno disuelto en agua, descomposición de materia orgánica, elevada concentración de dióxido de carbono; predisponen a la aparición de enfermedades bacterianas. Las mismas, pueden provocar altos índices de mortalidad y en determinados casos alcanzar el 100% (Boijink & Brandão, 2001)

Las bacterias no solo producen pérdidas económicas por las muertes que provocan, sino que también retardan el crecimiento, la ganancia de peso y el consumo de los peces se ve impedido por las lesiones cutáneas que generalmente estas provocan. En la actualidad se han descrito una gran variedad de grupos bacterianos considerados patógenos para los peces, sin embargo, se considera a los bacilos Gram negativos el grupo causante de la mayor cantidad de mortalidad e impacto económico en la cría intensiva alrededor del mundo. Dentro de este grupo se encuentra *Aeromonas hydrophila* (Boijink, Brandão, Vargas, Costa & Renosto, 2001).

En la última década, brotes causados por una cepa virulenta de *A. hydrophila*, ha generado importantes pérdidas en la acuicultura mundial las cuales se estiman en 2200 toneladas de pescado muerto al año en China, mientras que en Estados Unidos supera las 150 toneladas (Rasmussen-Ivey, Figueras, McGarey & Liles 2016).

1.4 Importancia de *Aeromonas hydrophila* (Bacteria: Aeromonadaceae)

Debido a las discrepancias que existen en cuanto a la identificación de los aeromonadales, su estatus taxonómico ha ido cambiando con el tiempo. Históricamente, el género fue incluido en la familia Vibrionaceae pero estudios filogenéticos determinaron que debía formar su propia familia: Aeromonadaceae. De acuerdo a la edición más reciente del Manual de Bacteriología de Bergey's se listan 3 géneros dentro de la misma: *Aeromonas*, *Oceanimonas* y *Tolumonas*. Según el mismo, 17 especies han sido oficialmente aceptadas dentro del género *Aeromonas* (Martin Carnahan & Joseph, 2005).

Existen dos grandes grupos dentro del género *Aeromonas* y se diferencian según la temperatura de crecimiento en: psicrófilas y mesófilas. Las especies psicrófilas son inmóviles y crecen generalmente en un rango de temperatura entre 2 a 30 °C. Este grupo está representado por *A. salmonicida*, un importante patógeno para los peces. El grupo de las mesófilas tiene la particularidad de ser móvil debido a la presencia de un flagelo polar y la temperatura óptima de crecimiento varía desde los 22 a 37°C. Abarca a la mayoría de las especies del género, entre las que se destacan: *A. hydrophila*, *A. sobria* y *A. caviae* (Martin Carnahan y Joseph, 2005). Ocasionan la aeromoniasis, enfermedad que afecta a varios animales, incluido el ser humano (Acha & Szyfres, 2001).

En la actualidad, el género *Aeromonas* es motivo de estudio constante para la medicina humana ya que se lo considera un importante patógeno capaz de causar una variedad de síndromes y enfermedades que van desde una simple gastroenteritis hasta condiciones potencialmente mortales como septicemias en personas inmunocomprometidas. Determinados estudios demostraron que dentro del género son tres las especies responsables de la mayoría (85%) de las

infecciones causadas en humanos; entre ellas se encuentra *Aeromonas hydrophila* (Janda & Abbott, 2010).

A. hydrophila es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, de aproximadamente 0,3 a 1,0 μm de diámetro y 1,0 a 3,5 μm de longitud. No esporula ni tiene cápsula, pero cuenta con un flagelo polar el cual le confiere la característica de ser móvil. La temperatura óptima de crecimiento es de 28° C, pero en medios de cultivos artificiales puede darse a 37° C en donde se desarrollan colonias de color blanco a rosa pálido, redondas, convexas y de bordes enteros (Aoki, 1999).

A. hydrophila es un habitante normal del medio acuático que actúa como patógeno oportunista de una gran variedad de animales. En peces de cultivo de agua dulce causa la enfermedad conocida como Septicemia por *Aeromonas* móviles (SAM) la cual es considerada como una de las principales enfermedades en la acuicultura mundial (Aoki, 1999).

Sin embargo, la bacteria forma parte de la microflora intestinal de los peces sanos por lo que la presencia de la misma no es indicativa de enfermedad y, en consecuencia, se le atribuye a los factores estresantes un rol importante para que se desencadenen brotes de SAM (Cipriano, 2001).

Se han descrito múltiples factores de virulencia que cumplirían un rol importante en la patogénesis de la enfermedad producida por *A. hydrophila* para lograr colonizar, replicarse, evadir el sistema inmune del huésped y generar daños en los tejidos del mismo. Entre ellos se destacan las proteínas extracelulares secretadas por la bacteria como las hemolisinas, enterotoxinas, proteasas, lipasas, amilasas, quitinasas y sideróforos (Yu et al., 2004; Rodríguez, Botero, Iregui & Figueroa, 2005).

Los signos clínicos que caracterizan la SAM van desde pequeñas lesiones superficiales que producen el desprendimiento de las escamas hasta hemorragias y necrosis de órganos internos principalmente en branquias, hígado, riñones e intestino. Puede observarse también ascitis, úlceras, abscesos, exoftalmia, anemia, hemorragias en piel y en la aleta caudal (Austin & Austin, 2007).

En un relevamiento de enfermedades de peces ornamentales realizado en nuestro país (Carnevia et al., 2010) se colectaron peces afectados de criaderos y comercios, a los cuales se les realizó el examen clínico, histopatología, necropsia y aislamientos bacterianos, resultando que de 105 casos un 57,6% correspondieron a un cuadro de Septicemia Hemorrágica Bacteriana (SHB), siendo *Pseudomonas fluorescens* y *Aeromonas hydrophila* los patógenos más comúnmente aisladas.

Dentro de este estudio se encontraron tres formas clínicas de presentación de SAM. La forma aguda septicémica fue la más encontrada identificándose en un 63,1% de los casos; cursando con alta mortalidad y asociada a una severa parasitosis. Los síntomas desarrollados no son patognomónicos y se incluyen letargia, anorexia, opacidad de piel e insuficiencia respiratoria. En los hallazgos de necropsia se observó hígado con infiltración grasa, esplenomegalia y hemorragias petequiales en músculos y órganos internos.

La forma subaguda ascítica se encontró en el 21,1% de los casos presentando severa ascitis como signo principal además de anorexia y letargia. En la necropsia se evidenció hemorragias en peritoneo, contenido ascítico tanto seroso, serosanguinolento como purulento y múltiples abscesos en peritoneo, bazo, riñón e hígado.

La forma crónica ulcerosa cursa con baja mortalidad y en algunos casos los peces pueden curarse actuando como portadores. Los peces manifestaban adelgazamiento, úlceras en la piel e hígado friable en las necropsias, aunque no todas presentaban lesiones en órganos internos. La prevalencia es baja habiéndose presentado en el 15,7% de los casos.

En las 3 presentaciones de la enfermedad, la bacteria más comúnmente aislada fue *Aeromonas hydrophila* siendo en la forma crónica ulcerosa la única bacteria encontrada.

Otro estudio relevante que se llevó a cabo fue la caracterización fenotípica, molecular y patológica de *Aeromonas* móviles aisladas en peces comestibles y ornamentales cultivados en Uruguay, donde *Australoheros facetus* fue empleado en desafíos experimentales. El mismo demostró que *Aeromonas hydrophila* y *A. veronii* son las especies identificadas más frecuentemente (Perretta, Zunino & Antúnez 2018).

Si bien existen estudios previos llevados a cabo en nuestro país en los que se caracterizan las presentaciones clínicas de SAM en varias especies de peces ornamentales (Carnevia et al., 2010), hasta el momento el cuadro clínico y los hallazgos hematológicos en *Australoheros facetus* no han sido determinados, a pesar de ser una especie empleada en la investigación de la enfermedad.

Teniendo en cuenta la importancia de la especie como animal de laboratorio en nuestro país y la relevancia de *Aeromonas hydrophila* para la piscicultura y la salud pública, consideramos relevante llevar a cabo esta investigación.

2. HIPÓTESIS

Las castañetas (*Australoheros facetus*) desafiadas experimentalmente con *Aeromonas hydrophila* por vía intraperitoneal desarrollarán un cuadro compatible con la septicemia por *Aeromonas* móviles.

3. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el cuadro clínico y leucograma diferencial de castañetas (*Australoheros facetus*) desafiadas experimentalmente con una dosis letal cincuenta a 96 horas (DL5096) de *Aeromonas hydrophila* por vía intraperitoneal.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1.1 Realizar el conteo diferencial de leucocitos y determinar el efecto que tienen sobre el mismo los factores tiempo y desafío experimental.

3.1.2 Determinar la frecuencia de observación de los signos clínicos más relevantes en los animales desafiados experimentalmente y determinar el efecto del tiempo sobre los mismos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1 Origen de las bacterias y confección del inóculo

Se empleó el aislamiento H2 de *Aeromonas hydrophila* (número de acceso en Genbank: MF629003), proveniente de la colección de aislamientos bacterianos del Instituto de Investigaciones Pesqueras. Para la confección del inóculo se descongeló una alícuota de cultivo de la colección mediante siembra en agar TSA e incubación a 25°C durante 24-48 horas. Una vez obtenidas colonias puras aisladas, se suspendieron en PBS estéril hasta alcanzar una concentración equivalente a la DL50₉₆ (2.5×10^6 UFC.mL⁻¹) previamente calculada para la especie (Perretta et al., 2018). La concentración bacteriana deseada se estimó a partir del ajuste de la turbidez de la suspensión a una densidad óptica próxima a 0.016 (midiendo a 625 nm de longitud de onda).

4.2 Desafío experimental

Se emplearon juveniles de *Australoheros facetus* de 15 gramos de peso promedio, aportados por el bioterio de organismos acuáticos del Instituto de Investigaciones Pesqueras (FVet-UdelaR). Dos grupos de 100 peces, clínicamente sanos y provenientes de un mismo desove, se alojaron en acuarios individuales de 150 litros cada uno, con filtración biológico-mecánica, aireación y temperatura constante de $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Una vez culminado un período de 10 días de aclimatación a las condiciones de alojamiento, con alimentación *ad-libitum*, a un grupo de animales se le inyectó 10 uL.g⁻¹ del inóculo descrito previamente por vía intraperitoneal, mientras que el otro grupo recibió igual volumen de PBS estéril.

Todas las maniobras que pudieron implicar dolor o estrés excesivo se realizaron bajo sedación con Eugenol en baño, según protocolo de la CHEA número 1002 aprobado el 17 de junio de 2020.

4.3 Conteo diferencial de leucocitos

A las 24, 48, 72 y 96 horas post-inoculación se sacrificaron 10 peces de cada grupo, por sobredosis de anestésico. Se extrajo sangre periférica de cada individuo mediante punción de la vena caudal y se realizó frotis directo en portaobjetos. Dichos frotis se fijaron con metanol por evaporación y posteriormente se realizó la tinción con May Grunwald -Giemsa según protocolo descrito por Keim (1986). El conteo de células se hizo por observación directa al microscopio óptico bajo objetivo de inmersión (1000x). El cálculo de los porcentajes de cada uno de los tipos celulares se realizó sobre un conteo mínimo de 200 leucocitos totales (Ranzani-Paiva, de Pádua, Tavares-Dias & Egami 2013).

4.4 Registro de signos clínicos y muestreo de animales

Los datos clínicos se recabaron 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, 72 y 96 horas post-inoculación (PI), previo a la realización de cualquier maniobra diaria en los acuarios y con el observador ubicado siempre en el mismo lugar. 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 se retiraron del acuario luego de evaluada la conducta de los animales hacia el alimento.

4.5 Análisis estadístico

Se determinó la significancia estadística de las diferencias observadas en la frecuencia de observación de signos clínicos a diferentes horas post-inoculación 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 Prism 8 de Graphpad con un nivel de confianza del 95%. El nivel de significación fue $P < 0.05$.

5. Resultados

5.1 Leucograma diferencial

En la tabla 1 se presenta el conteo diferencial de leucocitos de *Australoheros facetus* desafiados experimentalmente con *Aeromonas hydrophila*.

Tabla 1. Conteo diferencial de leucocitos de *Australoheros facetus* a diferentes días post-infección experimental (p.i) con *Aeromonas hydrophila* (media \pm ds).

Días p.i.	Linfocitos (%)	Neutrófilos (%)	Basófilos (%)	Eosinófilos (%)	Monocitos (%)
1	75,7 \pm 7,9 ^a	22,5 \pm 8,4 ^c	1,3 \pm 1,5	0	0,4 \pm 0,8
2	77,9 \pm 14,4 ^a	19,9 \pm 12,1 ^c	1,0 \pm 1,7	0,1 \pm 0,4	0,9 \pm 1,5
3	75,2 \pm 19,2 ^a	22,9 \pm 18,4 ^c	1,5 \pm 1,8	0	0,4 \pm 0,6
4	85,0 \pm 14,0 ^a	13,2 \pm 14,0 ^c	0,7 \pm 0,5	0,8 \pm 1,7	0,2 \pm 0,4
Control	55,5 \pm 5,9 ^b	43,8 \pm 7,0 ^b	0,5 \pm 1,1	0	0

a \neq b \neq c, letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0,05$

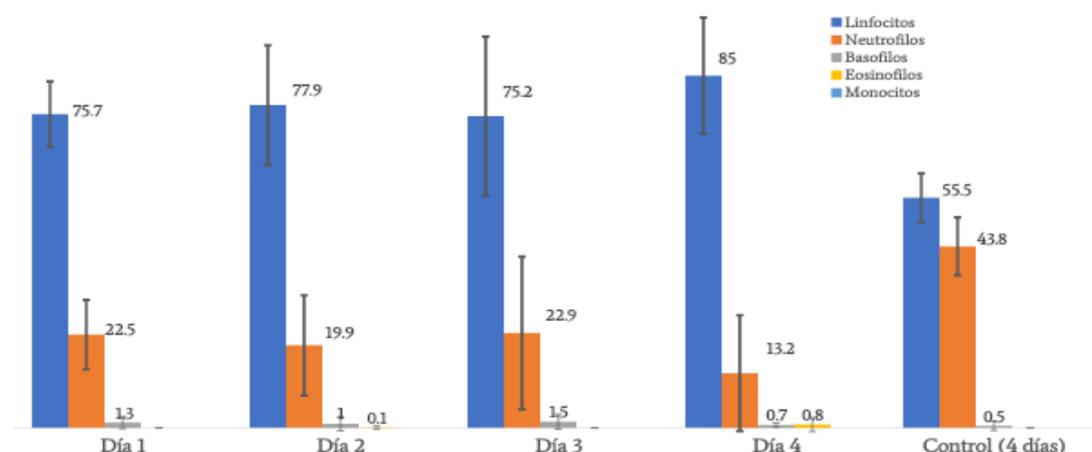
Se aprecian diferencias en los valores de linfocitos y neutrófilos presentados por los animales desafiados y no desafiados experimentalmente, no existiendo diferencias entre los conteos celulares en los distintos días post-infección.

No se observaron alteraciones en la fórmula de basófilos, eosinófilos y monocitos, ya sea entre tratamientos o entre días.

Teniendo en cuenta que la fórmula leucocitaria no se vio afectada por el día post-infección, se calcularon los porcentajes promedio de cada tipo celular para los animales desafiados y del grupo control.

- Linfocitos: 78,4 \pm 11,1% -Control 55,5 \pm 5,9%
- Neutrófilos: 19,6 \pm 2,3% -Control 43,8 \pm 7,0%
- Basófilos: 1,1 \pm 0,6% -Control 0,5 \pm 1,1%
- Eosinofilos: 0,2 \pm 0,8% -Control 0%
- Monocitos: 0,5 \pm 0,5%. -Control 0%

Gráfica 1 -Leucograma diferencial-



En las **figuras 2 y 3** se pueden apreciar algunos de los elementos formes que se encuentran en la sangre de *Australoheros facetus* desafiados experimentalmente con *Aeromonas hydrophila*.

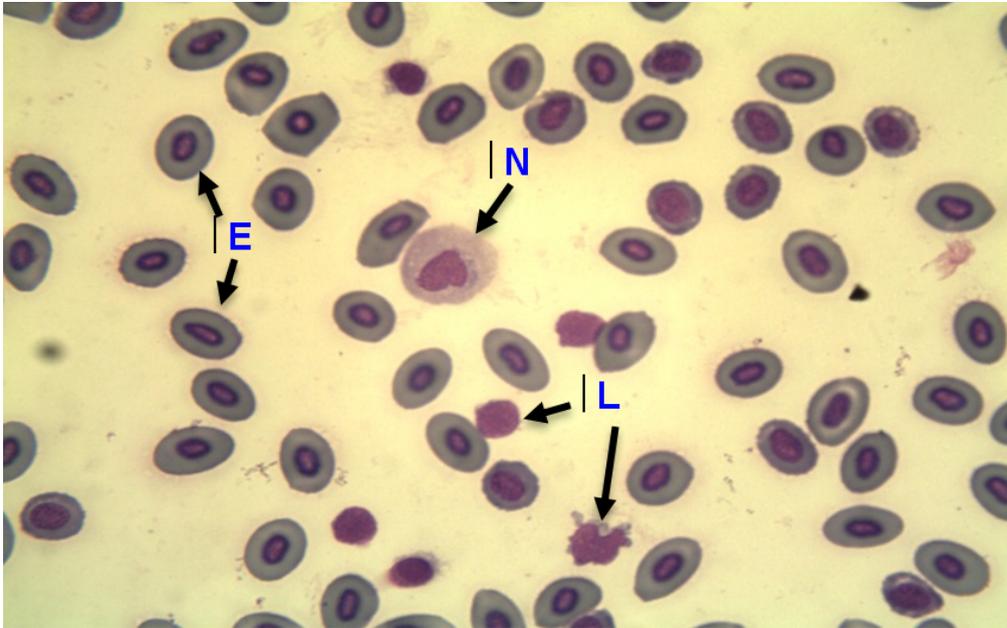


Figura 2. Microfotografía de frotis de sangre de *Australoheros facetus* en la que se observan eritrocitos (E), linfocitos (L) y neutrófilos inmaduros (N) (tinción de May Grunwald -Giemsa 1000X).

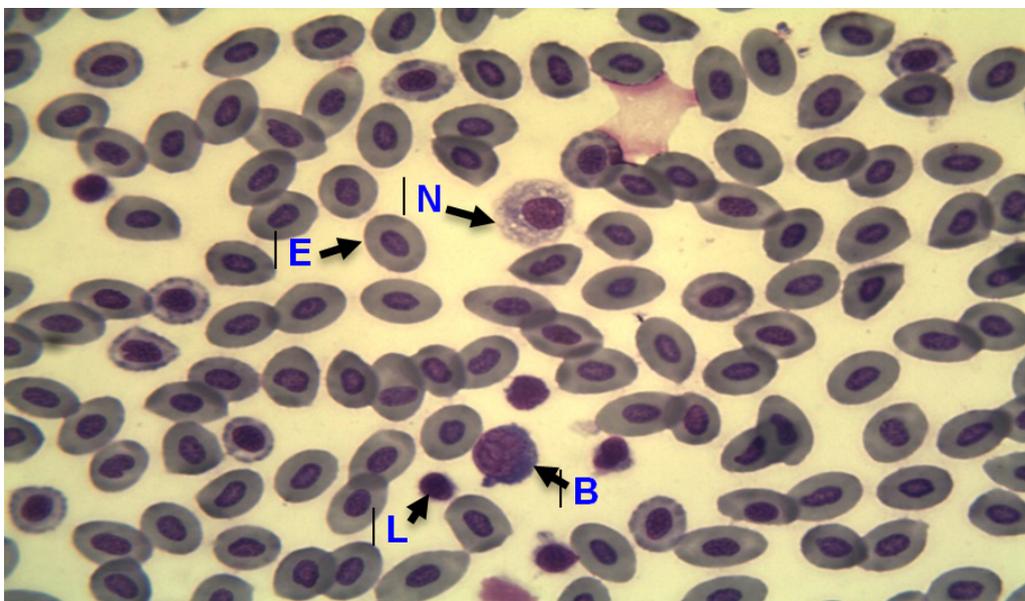


Figura 3. Microfotografía de frotis de sangre de *Australoheros facetus* Se observan basófilos (B), eritrocitos (E), linfocitos (L) y neutrófilos (N) (tinción de May Grunwald -Giemsa 1000X).

5.2 Signos clínicos

La frecuencia de cada uno de los signos clínicos expresados por los animales desafiados experimentalmente y el momento de su aparición se detallan en la tabla número 2.

No se observaron signos clínicos en los animales del grupo control.

Tabla 2. Signos clínicos expresados por *Australoheros facetus* a diferentes días post-infección experimental (p.i.) con *Aeromonas hydrophila* por vía intraperitoneal. El porcentaje indica el número de animales que expresaron cada uno de los signos.

Días p.i.	Anorexia (%)	Letargia (%)	Aletas Congestivas (%)	Ano hemorrágico (%)	Ascitis (%)	Exoftalmia (%)
1	100 ^a	10 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
2	100 ^a	50 ^b	65 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a
3	100 ^a	100 ^c	75 ^b	30 ^b	50 ^b	25 ^b
4	100 ^a	100 ^c	100 ^b	30 ^b	80 ^c	25 ^b
Control	0 ^b	0 ^d	0 ^d	0 ^c	0 ^d	0 ^c
Análisis estadístico	KW:107,92 p<0,01	KW:76,16 p<0,01	KW:56,23 p<0,01	KW:36,23 p<0,01	KW:49,33 p<0,01	KW:22,13 p<0,01

KW: estadístico Kruskal-Wallis; ^{a≠b≠c≠d} (comparación no válida entre distintos signos clínicos)

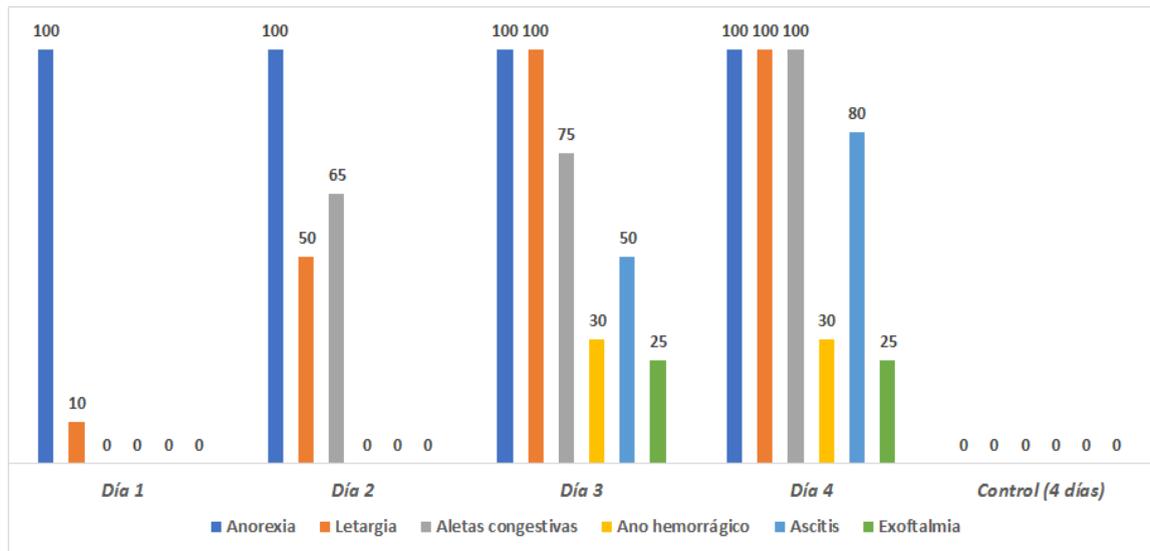
En el grupo de animales desafiados, los signos clínicos comportamentales fueron observados en primera instancia. La anorexia fue evaluada y considerada en aquellos animales que no respondieron frente al estímulo con alimentos. La misma se manifestó en el 100% de los animales desde el 1er día post-infección y se mantuvo en el total de los animales en los días sucesivos.

Consideramos letárgicos aquellos animales que presentaron disminución en su actividad y se mantuvieron en el fondo de las peceras sin responder a estímulos externos. La letargia se observó en el 10% de los animales al 1er día post-infección, alcanzando el 100% de los animales al 3er día.

Los signos clínicos sistémicos se observaron al 2do y 3er día post-infección. Las aletas congestivas y la ascitis se observaron en mayor porcentaje de animales a medida que transcurría el tiempo y avanzaba la infección, alcanzando el 100% y el 80% respectivamente al 4to día post-infección.

La exoftalmia y el ano hemorrágico se observaron a partir del 3er día post-infección en un 25% y 30% de los animales respectivamente, y se mantuvo el mismo porcentaje al 4to día.

Gráfica 2 -Signos clínicos-



En la **figura 4** se muestran ejemplares de *Australoheros facetus* eutanasiados, con un marcado abdomen distendido (AD) con zonas de epitelio congestivo (ZC) y zonas pálidas (ZP), ano hemorrágico (AH) y exoftalmia (EX).

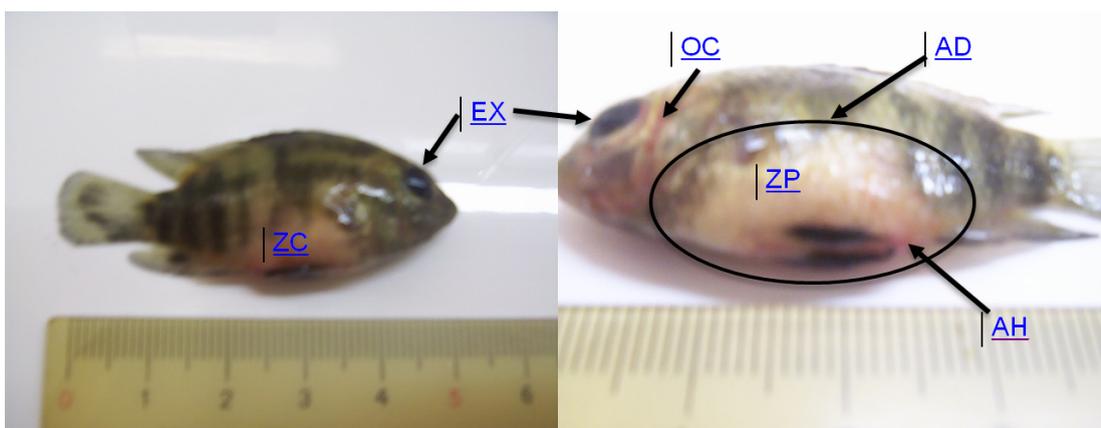


Figura 4. Ejemplares de *Australoheros facetus* eutanasiados para toma de muestras. Puede apreciarse el abdomen distendido (AD) con zonas pálidas (ZP) y zonas congestivas (ZC) según el ejemplar, ano hemorrágico (AH), opérculos congestivos (OC) y exoftalmia (EX).

6. Discusión

Si bien no existe información acerca de la susceptibilidad y patogenicidad de esta bacteria para la mayoría de las especies de peces de la región neotropical, debido a su abundancia y a las características de invasividad y escasa especificidad que posee *Aeromonas hydrophila* (Sen & Rodgers, 2004) es posible suponer que es capaz de desarrollar alguna de las formas de presentación de SAM en dichos animales.

Esta es la primera experiencia de desafío experimental de *Australoheros facetus* con *Aeromonas hydrophila*. A su vez, es el primer registro de las características clínicas y del conteo diferencial de células sanguíneas tanto en animales infectados como no infectados para esta especie de peces.

Si bien los signos clínicos observados en los peces infectados no son característicos de un proceso patológico en particular, la presencia de algunas alteraciones tales como los fenómenos hemodinámicos en los epitelios y la colecta de líquido en cavidades corporales hacen sospechar la existencia de un evento septicémico con liberación al medio de toxinas bacterianas (Aoki, 1999). En este sentido cabe destacar que se han descrito varias enzimas extracelulares de *A. hydrophila* (hemolisinas, citotoxinas, citotoninas, entre otras) capaces desarrollar en el animal infectado cuadros hiperémicos generalizados con extravasación de fluidos y sangre entera hacia las cavidades corporales (Pemberton, Kidd & Schmidt., 1997).

La anorexia, presente durante toda la experiencia en el total de los animales desafiados, implica uno de los mayores inconvenientes en el tratamiento de esta enfermedad en peces de cultivo, dado que la terapéutica más frecuente consiste en la adición de antimicrobianos en el alimento.

En relación con los análisis sanguíneos realizados en el marco de esta tesis, cabe destacar que la hematología es una herramienta de diagnóstico útil y sencilla que le permite al veterinario, a partir de una pequeña muestra de sangre, obtener información para detectar enfermedades o cambios fisiológicos en los animales orientando al mismo en la evaluación del estado de salud y en las opciones de tratamiento a instaurar (Grant, 2015).

Teniendo en cuenta los valores del grupo control de nuestro estudio, podemos suponer que la respuesta de las células sanguíneas de *Australoheros facetus* ante la infección experimental con *Aeromonas hydrophila* consistió en un aumento en el porcentaje de linfocitos circulantes de casi un 23%. En contraposición a esto, se apreció una disminución del 24,2% en el porcentaje de neutrófilos que presentaron los animales infectados. consideramos adecuado aclarar que si bien los resultados muestran una alteración en la fórmula leucocitaria respecto al control, no podemos hablar en términos absolutos (linfocitosis, neutropenia), ya que en el análisis sanguíneo no se realizó el conteo total de leucocitos, por ende no es posible saber el número total de cada tipo celular.

Estos hallazgos refuerzan la idea del desarrollo de un cuadro septicémico en los animales infectados, debido a que las alteraciones del recuento diferencial son

indicativas de una elevada actividad fagocítica en sangre, caracterizada por el consumo de neutrófilos en etapas tempranas de la infección y el aumento del número de linfocitos circulantes (Vásquez-Piñeros, Rondón-Barragán, Restrepo-Betancur & Eslava-Mocha, 2010)

La escasez de trabajos que emplean el conteo diferencial de leucocitos como herramienta diagnóstica en peces dificultan la realización de estudios comparativos entre nuestros hallazgos y lo observado tanto en *Australoheros facetus* como en otras especies. A pesar de ello se destaca la utilidad de esta técnica dada su sencillez y la calidad de información que brinda.

7. Conclusiones

Australoheros facetus es una especie susceptible de ser desafiada experimentalmente con *Aeromonas hydrophila* por vía intraperitoneal.

El cuadro clínico desarrollado por los animales desafiados experimentalmente se caracteriza, en etapas tempranas de la infección, por la presencia de anorexia y letargia en un elevado número de individuos, posteriormente y en menor frecuencia pueden observarse, aletas congestivas, ano hemorrágico, ascitis y exoftalmia a medida que avanza la infección.

Los hallazgos hemáticos en los animales desafiados experimentalmente se caracterizan por un aumento en el porcentaje de linfocitos y una disminución en el porcentaje de neutrófilos, sin alteración en el porcentaje de basófilos, eosinófilos y monocitos con respecto a los peces no desafiados.

8. Bibliografía

- Acha, P. N., & Szyfres, B. (2001). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Vol 1. Bacteriosis y Micosis. Ed.: Organización Panamericana de la Salud. Washington, DC.
- Aoki, T. (1999). Motile Aeromonads (*Aeromonas hydrophila*). En: Woo, P.T.K. & D. W. Bruno (ed.). Fish Diseases and Disorders, Volumen 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections, 527-553 pp. CABI Publishing, Wallingford
- Austin, B., & Austin, D. A. (2007). Bacterial Fish Pathogens. Diseases of Farmed and Wild Fish. Praxis Publishing Ltd, Chichester, UK. 552 pp
- Boijink, C. D. L. Brandão, D. A. (2001). Alterações histológicas e comportamentais provocadas pela inoculação de suspensão bacteriana (*Aeromonas hydrophila*) em juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*). *Ciência Rural*, 31(4), 687-690.
- Boijink, C. D. L. Brandão, D. A., Vargas, A.C. , D., Costa, M. M. D., & Renosto, A. V. (2001). Inoculação de suspensão bacteriana de *Plesiomonas shigelloides* em jundiá, *Rhamdia quelen* (teleostei: pimelodidae). *Ciência Rural*, 31(3), 497-501.
- Calviño, P. A. (2007). Precisión sobre la localidad tipo de cuatro especies de peces de aguas continentales colectadas por Charles Darwin, en Maldonado, Uruguay. *Boletín del Killi Club Argentino*, 13(11). 40-51.
- Carnevia, D. (2017). Descripción del desarrollo larvario post-eclosión de *Australoheros facetus* Jenyns, 1842 (OSTEICHTYES, PERCIFORMES, CICHLIDAE) en laboratorio. *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay*, [S. l.], v. 26, n. 1-2, p. 27–29.
- Carnevia, D., Rosso, A., Letamendia, D., Carnales, D. & Perretta, A. (2013). Segundo relevamiento de pisciculturas ornamentales en Uruguay. *Actas del I Congreso Internacional de Veterinaria*, p66

- Carnevia, D., Letamendía, M., Perretta, A., & Delgado, E. (2010). Caracterización de septicemia hemorrágica bacteriana (SHB), diagnosticada en peces ornamentales de Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 46(177-180), 27-32.
- Cipriano, R. C. (2001). *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish (No. 68). US Fish and Wildlife Service.
- FAO. 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. 224 p.
- Grant, K. R. (2015). Fish hematology and associated disorders. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, 18(1), 83-103.
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2010). The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical microbiology reviews*, 23(1), 35-73.
- Keim, A. (1982). Manual de métodos parasitológicos e histopatológicos en piscicultura.
- Martin-Carnahan, A., Joseph, S. W., & Genus, I. (2005). *Aeromonas* Stanier 1943. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Ed.: Springer. Philadelphia, US.
- Pemberton, J. M., Kidd, S. P., & Schmidt, R. (1997). Secreted enzymes of *Aeromonas*. *FEMS Microbiology Letters*, 152(1), 1-10.
- Perretta, A., Antúnez, K., & Zunino, P. (2018). Phenotypic, molecular and pathological characterization of motile aeromonads isolated from diseased fishes cultured in Uruguay. *Journal of fish diseases*, 41(10), 1559-1569.
- Vásquez-Piñeros, M. A. V., Barragán, I. S. R., Betancur, L. F. R., & Mocha, P. R. E. (2010). Estudio clínico y hematológico de una infección experimental con *Aeromonas hydrophila* y *Edwardsiella tarda* en tilapia, *Oreochromis* sp. *Orinoquia*, 14(1), 33-44.
- Ranzani-Paiva, M. J. T. R., de Pádua, S. B., Tavares-Dias, M., & Egami, M. I. (2013). *Métodos para análise hematológica em peixes*. Ed.: Editora da Universidade Estadual de Maringá-EDUEM. Paraná.

- Rasmussen-Ivey, C.R., Figueras, M. J., McGarey, D., & Liles, M. R. (2016). Virulence factors of *Aeromonas hydrophila*: in the wake of reclassification. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1337.
- Rodríguez, M., Botero, E., Iregui, C. A., & Figueroa, J. (2005). Extracción de productos extracelulares de *Aeromonas hydrophila* y sus efectos en Tilapia roja (*Oreochromis spp.*) y Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). *Acta Biológica Colombiana*, 10(2), 75-93.
- Sen, K., & Rodgers, M. (2004). Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. *Journal of applied microbiology*, 97(5), 1077-1086.
- Serra S., Bessonart, J., Teixeira de Mello F. Duarte A., Malabarba L., Loureiro M. (2014). *Peces del Rio Negro*. Montevideo, MGAP-DINARA. 208p.
- Teixeira de Mello, F., González-Bergonzoni, I., & Loureiro, M. (2011). *Peces de agua dulce del Uruguay*. PPR-MGAP. Montevideo.
- Torroella, J. J. (1998). Aspectos generales de patología infecciosa: Patología en acuicultura. Plan de formación de técnicos superiores en acuicultura Madrid, España: Ed CATACT.
- URUGUAY. PLAN NACIONAL DE DESARROLLO DE LA ACUICULTURA. 2008a. Estrategia general para el desarrollo de la acuicultura sostenible en la República Oriental del Uruguay. Montevideo, DINARA-FAO. 40 p
- URUGUAY. PLAN NACIONAL DE DESARROLLO DE LA ACUICULTURA. 2008b. Política Nacional para el desarrollo de la acuicultura sostenible en la República Oriental del Uruguay. Montevideo, DINARA-FAO. 28 p.
- Yu, H. B., Rao, P. S., Lee, H. C., Vilches, S., Merino, S., Tomas, J. M., & Leung, K. Y. (2004). A type III secretion system is required for *Aeromonas hydrophila* AH-1 pathogenesis. *Infection and immunity*, 72(3), 1248-1256.