

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Caracterización del cuadro clínico, leucograma diferencial y hallazgos de necropsia en peces espada (*Xiphophorus hellerii*) desafiados experimentalmente con *Aeromonas hydrophila* (Bacteria: Aeromonadaceae)

por

MONTERO CORTE María Fernanda

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
2022**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de Mesa:



.....
Dr. Daniel Carnevia.

Segundo miembro (Tutor):



.....
Dr. Alejandro Perretta.

Tercer miembro:



.....
Dra. Maite Letamendía.

Autor:



.....
Br. Fernanda Montero.

Fecha:

Martes 19 de abril de 2022.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecer a mi familia por la motivación, la fuerza y el apoyo en todo momento durante estos años.

Al Dr. Alejandro Perretta y Dr. Daniel Carnevia por su tiempo, dedicación y paciencia.

A los compañeros del Área Acuicultura y Patología de Organismos Acuáticos, por la colaboración, enseñanza y compañerismo.

Al Instituto de Investigaciones Pesqueras por la disposición de los materiales y equipos.

A mis amigos, amigas que siempre están y a los compañeros de Facultad, por los momentos vividos en estos años.

TABLA DE CONTENIDO

<u>PÁGINA DE APROBACIÓN</u>	2
<u>AGRADECIMIENTOS</u>	3
<u>LISTA DE TABLAS Y FIGURAS</u>	5
<u>RESUMEN</u>	6
<u>SUMMARY</u>	7
<u>INTRODUCCIÓN</u>	8
<u>Importancia pez espada (<i>Xiphophorus hellerii</i>)</u>	9
<u>Importancia <i>Aeromonas hydrophila</i> (Bacteria: Aeromonadaceae)</u>	10
<u>Importancia Septicemia por <i>Aeromonas Móviles</i></u>	11
<u>HIPÓTESIS</u>	14
<u>OBJETIVO GENERAL</u>	15
<u>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</u>	15
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	16
<u>Origen y mantenimiento de los peces</u>	16
<u>Origen de las bacterias y confección del inóculo</u>	16
<u>METODOLOGÍA - Desafío experimental</u>	17
<u>Registro de signos clínicos y muestreo de los animales</u>	17
<u>Conteo diferencial de leucocitos</u>	17
<u>Análisis estadístico</u>	17
<u>RESULTADOS</u>	19
<u>DISCUSIÓN</u>	21
<u>CONCLUSIONES</u>	25
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	26

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Frecuencia de identificación de signos clínicos en peces espada (*Xiphophorus hellerii*) a las 12 y 24 horas pos desafío experimental (PD) con *Aeromonas hydrophila*.....pag.19.

Tabla 2. Conteo diferencial de leucocitos de peces espada (*Xiphophorus hellerii*) a las 12 y 24 horas pos desafío experimental (PD) con *Aeromonas hydrophila*.....pag.19.

Tabla 3. Principales hallazgos de necropsia observados en *Xiphophorus hellerii* desafiados experimentalmente con *Aeromonas hydrophila*.....pag.20.

Figura 1. A. Macho y hembra de pez espada (*Xiphophorus hellerii*) donde se aprecia el dimorfismo sexual y la coloración de los individuos salvajes. **B.** Macho de pez espada rojo en el que se observa la aleta caudal espigada conocida como “espada” (Tomado de: <http://acuarioadictos.com/xiphophorus-helleri/>).....pag.10.

Figura 2. Células sanguíneas de *Xiphophorus hellerii*: **A.** Linfocito (flecha). **B.** Monocito (flecha). **C.** Eosinófilo (flecha). **D.** Neutrófilo (flecha).....pag.20.

RESUMEN

Aeromonas hydrophila es uno de los principales patógenos bacterianos que afecta la piscicultura de agua dulce a nivel mundial. La septicemia por *Aeromonas* móviles (SAM) es uno de los síndromes más importantes desarrollado por *A. hydrophila* y otros miembros de la familia Aeromonadaceae, patología ésta que ocasiona serias pérdidas económicas a los productores dadas las elevadas mortalidades que se registran. Este patógeno ha sido aislado de varias especies de organismos acuáticos de cultivo en nuestro país, habiendo sido responsable de epizootias con importantes pérdidas en establecimientos de producción de peces tanto ornamentales como para consumo humano. A pesar de la importancia económica de este agente y de su potencial zoonótico, existe muy poca información generada acerca de las características del cuadro patológico desarrollado en peces tropicales ornamentales y mucho menos cuando se trata de cepas locales de la bacteria. En el presente trabajo se evaluó el efecto del desafío con *Aeromonas hydrophila* sobre la expresión de signos clínicos, el recuento diferencial de leucocitos en el pez espada (*Xiphophorus hellerii*), así como también se registraron los principales hallazgos de necropsia observados en los animales desafiados. Para ello se llevó a cabo un desafío experimental por vía intraperitoneal con una dosis bacteriana equivalente a la dosis letal cincuenta en 96 horas determinada previamente para dicho aislamiento de *A. hydrophila*. A las ocho, 12 y 24 horas posdesafío 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. A partir de la experiencia llevada a cabo fue posible reproducir un cuadro típico de SAM los peces desafiados. Los signos clínicos aletas congestivas, anorexia, ascitis, nado errático y materia fecal con mucus se presentan a partir de las 12 horas posdesafío experimental (PD). A las 24 horas PD aumenta la frecuencia de observación de los signos mencionados y se aprecia la aparición de nuevos signos de mayor gravedad, tales como exoftalmia y ano hemorrágico. A las 12 horas PD, por otra parte, se aprecia también una disminución de linfocitos circulantes del 48%, acompañada por un aumento en el número relativo de neutrófilos. Estas diferencias en el leucograma diferencial con respecto al control se mantienen durante todo el período de experimentación. Los hallazgos de necropsia más característicos del desafío experimental con *A. hydrophila* en *X. hellerii* por vía intraperitoneal son: pérdida de consistencia en pared abdominal, branquias pálidas y presencia de líquido serosanguinolento en cavidad abdominal. Por otra parte se puede apreciar en menor grado la presencia de hígado friable, ano protruido, desprendimiento de mucosa intestinal y contenido serosanguinolento en tubo digestivo.

SUMMARY

Aeromonas hydrophila is one of the main bacterial pathogens affecting freshwater fish farming worldwide. Motile *Aeromonas* septicemia (MAS) is one of the most important syndromes developed by *A. hydrophila* and other members of the family Aeromonadaceae in fishes, a pathology that causes serious economic losses to farmers given the high mortalities that are recorded. This pathogen has been isolated from several species of aquaculture organisms in our country, having been responsible of epizootics with significant losses in fish farms both ornamental and for human consumption. Despite the economic importance of this agent and its zoonotic potential, there is very little information generated about the characteristics of the pathological frame developed in tropical ornamental fish, much less when it comes to local strains of the bacterium. The effect of the challenge with *Aeromonas hydrophila* on the expression of clinical signs, differential leukocyte count in swordfish (*Xiphophorus hellerii*), as well as the main necropsy findings observed in challenged animals. For this, an experimental challenge was carried out intraperitoneally with a bacterial dose equivalent to the fifty lethal dose in 96 hours previously determined for this isolate of *A. hydrophila*. At eight, 12 and 24 hours postchallenge the clinical signs expressed by all the fish were evaluated and a representative number of animals were sacrificed for blood collection and necropsies. From the experience carried out it was possible to reproduce a typical MAS frame in challenged fish. Congestive fins, anorexia, ascites, erratic swimming and fecal matter with mucus are clinical signs present since 12 hours post experimental challenge (PC). At 24 hours PC increases the frequency of observation of the mentioned signs and the appearance of new signs of greater severity, such as exophthalmia and haemorrhagic anus. At 12 hours PC, on the other hand, a decrease of 48% in circulating lymphocytes was also observed, accompanied by an increase in the relative number of neutrophils. These differences in differential leukogram with respect to control were maintained throughout the experimental period. The most characteristic necropsy findings of the experimental challenge with *A. hydrophila* in *X. hellerii* are: loss of consistency in the abdominal wall, pale gills and presence of serosanguinolent fluid in the abdominal cavity. On the other hand can be appreciated to a lesser degree the presence of friable liver, anus protruded and detachment of intestinal mucosa with serosanguinolent content in the digestive tract.

INTRODUCCIÓN

La venta de peces ornamentales se ha integrado en los últimos años a la profesión veterinaria, siendo comercializados en un gran número de clínicas de prácticamente todas las capitales departamentales. Algunas de las limitantes económicas que posee la actividad, derivan de los costos por tratamientos médicos y mortandades que deben afrontar tanto los vendedores como los criadores cuando se presentan epizootias. En la mayoría de los casos, estas epizootias son ocasionadas por bacterias o parásitos oportunistas que aprovechan el sistema inmune debilitado de los peces ya sea por estrés o por malas prácticas de manejo, para producir las afecciones (Carnevia, 1993; Wedemeyer, 1996). Algunas de las especies bacterianas que afectan a los peces ornamentales pueden constituir a su vez zoonosis de relevancia (Chacko y col., 2006; Miyazaki y Kaige, 1985; Perdomo y Carnevia, 2010).

Aeromonas hydrophila, se considera uno de los agentes etiológicos más importantes entre las enfermedades bacterianas de los peces. Es un bacilo Gram negativo muy común en los cuerpos de agua dulce y uno de los agentes causantes de la Septicemia por *Aeromonas* Móviles (SAM), una enfermedad sistémica de los peces que causa importantes pérdidas anuales en la acuicultura (Paniagua y col., 1990).

Además, esta especie bacteriana puede causar una amplia variedad de afecciones en humanos, que van desde infecciones de heridas hasta procesos sistémicos fatales (Janda y Duffey, 1988). Esta bacteria oportunista forma parte de la flora intestinal normal de peces y otros animales acuáticos (Cipriano, 2000); por lo que su sola presencia no es indicativo de enfermedad, factores ambientales y fisiológicos asociados a estrés contribuyen a la presentación de brotes de la enfermedad y en consecuencia a altas pérdidas económicas dentro de los cultivos de peces.

Cepas de *A. hydrophila* aisladas de procesos infecciosos poseen diferentes genes que actúan individual y conjuntamente, codificando la síntesis de diferentes factores de virulencia y permitiendo a las bacterias invadir las células del hospedero y diseminarse vía sanguínea a diferentes órganos (Chopra y col., 1999).

Estos genes intervienen en la patogenicidad de esta bacteria debido a la producción de factores de virulencia tales como las enzimas serin-proteasa, asociada con la activación de la aerolisina; colesterol aciltransferasa (GCAT,

por sus siglas en inglés) y genes que codifican para las lipasas *plc*, *lipH3*, *pla* y *lip*, entre otros (Chacón, 2003).

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

Existen otros factores de virulencia reportados para *A. hydrophila*, tales como la producción de proteasas y la presencia de adhesinas, pili, flagelina y sideróforos (Murugappan y col., 2006). Estos determinantes de virulencia están involucrados de forma secuencial para permitir a las bacterias colonizar, acceder, multiplicarse y causar daños en los tejidos del huésped y para evadir su sistema inmune (Yu y col., 2004).

A pesar de la importancia de esta enfermedad, tanto para la acuicultura nacional como mundial; así como también del poder zoonótico de este grupo de bacterias, existe muy poca información relacionada con la instalación y desarrollo del cuadro clínico de la SAM en peces ornamentales.

Importancia del pez espada (*Xiphophorus hellerii*)

En el mercado nacional de peces ornamentales se comercializan alrededor de 280.000 peces exóticos de clima tropical por año, dentro de los cuales *Xiphophorus hellerii* es una de las especies que se cultiva a gran escala (Carnevia, 2007).

X. hellerii, también llamado "Cola de Espada, Espada, Sable, Xifo espada ó Xipho", entre otras denominaciones (Figura 1), es un pez vivíparo, de agua dulce y clima tropical (22° a 28°C), cuya distribución geográfica se extiende desde el norte de México hacia el centro y occidente de Guatemala y Honduras en América Central (Axelrod y Wischnath, 1991). La especie fue introducida y se han establecido poblaciones naturales en el sur de Florida, California, el área del lago Mead, Arizona, Nevada, Hawái, Canadá, Puerto Rico, varios países de África, Sri Lanka, Australia, Guam, islas Fiji y Reino Unido (Dawes, 1991; Jacobs 1969). En América del Sur se pueden encontrar en países como Colombia (Welcomme, 1988) y Brasil (Sarmiento-Soares y col., 2012).

Una de las características principales en esta especie es el notorio dimorfismo sexual que presentan los animales adultos. Los machos en particular desarrollan una prolongación en la parte ventral de la aleta caudal que se proyecta varios centímetros hacia atrás del cuerpo, dándole así una cola con forma de espada, de ahí su nombre común (Figura 1B) (Tamaru y col., 2001).



Figura 1. **A.** Macho y hembra de pez espada (*Xiphophorus hellerii*) donde se aprecia el dimorfismo sexual y la coloración de los individuos salvajes. **B.** Macho de pez espada rojo en el que se observa la aleta caudal espigada conocida como “espada” (Tomado de: <http://acuarioadictos.com/xiphophorus-hellerii/>).

Importancia de *Aeromonas hydrophila* (Bacteria: Aeromonadaceae)

Aeromonas hydrophila es un bacilo Gram-negativo, móvil, habitante normal del agua y del tracto gastrointestinal de animales acuáticos y terrestres. Sin embargo, bajo condiciones ambientales no completamente conocidas, puede iniciar procesos patológicos en peces y mamíferos. Se aísla frecuentemente de peces enfermos y causa importantes mortandades con grandes pérdidas económicas (CTSA, 1996; Lilley y col., 1998).

Puede producir enfermedad como patógeno primario y en ocasiones como oportunista (Dooley y Trust, 1987; Loghothetis y Austin, 1996; Makapú, 1996). *A. hydrophila* es responsable de procesos de septicemia hemorrágica, un cuadro de enfermedad que afecta gran variedad de especies de animales ectotermos. La septicemia hemorrágica se caracteriza por la diseminación generalizada en forma de bacteriemia, seguida por la síntesis de toxinas, necrosis tisular y posterior fase clínica (Inglis, 1993). Las lesiones inducidas incluyen: hiperemia de capilares, exudación, hemorragias petequiales focales y leucocitosis, que es acompañada generalmente por niveles importantes de macrófagos circulantes pigmentados derivados de centros melanomacrófagos, así como exoftalmia asociada con edema pre-orbital (Roberts, 1989). La patogénesis de la enfermedad por *A. hydrophila* es multifactorial y puede involucrar el producto de numerosos y diferentes genes que actúan individual y conjuntamente, codificando la síntesis de diferentes factores de virulencia y permitiendo a las bacterias invadir las células del hospedero y diseminarse vía sanguínea (Chopra y col., 1999).

Cepas de *A. hydrophila* aisladas de procesos infecciosos, han mostrado la presencia de diferentes genes que intervienen en la patogenicidad de esta

bacteria como los son: la serina proteasa, asociada con la activación de la aerolisina; el colesterol aciltransferasa (GCAT, por sus siglas en ingles); genes codificadores de lipasa como plc, lipH3, pla, lip y genes de DNasa (Chacón, 2003). Adicionalmente se ha determinado la producción de una variedad de productos extracelulares (PEC) biológicamente activos, los factores de superficie, factores asociados a células, plásmidos y sistemas de restricción/modificación, que parecen desempeñar un papel importante en la patogénesis de la enfermedad en peces. No obstante, no se ha logrado esclarecer con exactitud cuál de todos es el que tiene mayor importancia en el desencadenamiento y desarrollo de la enfermedad (Thune y col., 1986; Khalil y Mansour, 1997).

Los PEC corresponden a las diferentes proteínas extracelulares secretadas por la bacteria que se obtienen a partir de un extracto crudo toxigénico, y entre las cuales están principalmente la α y β hemolisina, varias proteasas como la metaloproteasa termoestable (MPTE), una serin proteasa termoestable (SPTE) y otra termolábil (SPTL), lipasas, enterotoxinas como la citotóxica y la citotónica, sideróforos, quitinasas y amilasas. Los PEC de *A. hydrophila* causan muerte en peces al ser inoculados intraperitonealmente y cursan con lesiones extensas en músculo al ser inyectados por esta vía. Se considera que dicha acción se debe a la actividad de proteasas y hemolisinas (Allan y Stevenson, 1981; Thune y col., 1986; Cahill, 1990).

Existe controversia referente al papel de la β hemolisina en la patogénesis de la enfermedad en peces. En algunos estudios (revisado por Cahill 1990), no se encontró actividad tóxica de las hemolisinas en peces, en contradicción con los hallazgos de Allan y Stevenson (1981), quienes describieron correlación entre la producción de hemolisinas y toxicidad en estas especies. Khalil y Mansour (1997) atribuyeron la mortalidad en peces a las hemolisinas y proteasas. Estos dos factores de virulencia parecen ser los de mayor importancia en el desarrollo de la enfermedad en peces. Otros factores reportados para *A. hydrophila* son: la producción de proteasas que contribuyen a la utilización de nutrientes para la proliferación celular y que causan daño al tejido, presencia de adhesinas, pili, flagelina, la presencia de moléculas secuestradoras de hierro denominadas sideróforos (ligando específico de hierro de bajo peso molecular) (Murugappan y col., 2006), y la presencia de la capa S, arreglos de un tipo de proteína de superficie que forman una estructura supramolecular que encierra la bacteria y permite la interacción con tejidos y fluidos corporales (Kostrzynska y col., 1992).

Importancia Septicemia por *Aeromonas* Móviles

En nuestro país se reconocen tres formas clínicas de la enfermedad, cada una de las cuales cuenta con sintomatología característica: Aguda Septicémica, Subaguda Ascítica y Crónica Ulcerosa. Las principales bacterias aisladas de estos procesos infecciosos son *Aeromonas hydrophila* y *Pseudomonas fluorescens*, encontrando además otros Gram negativos en cuadros muy

severos. Es necesario resaltar que todas estas bacterias potencialmente pueden ser zoonosis (Carnevia y col., 2010).

La AGUDA SEPTICÉMICA es la forma más común de presentación (63,1 % de los casos) generalmente asociada a ectoparasitosis severa y síntomas como letargia, anorexia, opacidad de piel, algunas hemorragias superficiales e insuficiencia respiratoria. Son significativas las lesiones encontradas en la necropsia e histopatología: hemorragias petequiales en músculos y en órganos internos; esplenomegalia con destrucción de gran número de melanomacrófagos, degeneración de hepatocitos; así como el aislamiento de bacterias a partir del riñón (Miyazaki y Kaige, 1985; Aoki, 1998).

La forma SUBAGUDA ASCÍTICA es un cuadro descrito por varios autores afectando peces ornamentales que cursa con severa ascitis y lepidortosis (Carnevia, 1993; Chansue y col., 1999; Fijan, 1972; Soltani y col., 1998; Teixeira Filho, 1976). En un estudio realizado por Carnevia y col. (2010) en nuestro país ésta forma de presentación fue identificada en el 21,1% de los casos y cursó con anorexia, letargia, severa ascitis y lepidortosis como síntomas clínicos; presentando como lesiones internas hemorragias en peritoneo y lesiones en hígado (degeneración y necrosis). El contenido ascítico fue en su mayoría seroso pero también se observó serosanguinolento o purulento y en el 42,0 % de las necropsias múltiples abscesos en peritoneo, bazo, riñón e hígado. Fijan (1972) la considera una bacteriosis subaguda o crónica que cursa con una enteritis, severa peritonitis y síndrome hidrópico caracterizado por ascitis, lepidortosis y exoftalmía en su fase terminal. Aoki (1999) cita como lesiones típicas de esta afección: necrosis catarral de mucosa intestinal, degeneración de hepatocitos, necrosis de glomérulos renales y degeneración de epitelio de los túbulos renales.

La forma CRÓNICA ULCEROSA fue encontrada solo en un 15,8 % de los casos, cursando con anorexia, adelgazamiento y úlceras en piel. Esta forma fue encontrada en Poecílidos (*Poecilia reticulata*, *Poecilia latipinna* y *Xiphophorus variatus*) y Anabántidos (*Trichogaster trichopterus* y *Colisa lalia*), si bien está citada en otras familias de peces de agua dulce. Las principales lesiones encontradas, además de las úlceras en piel, fueron en el hígado (friable y con abundantes melanomacrófagos). La única bacteria aislada en estos casos fue *Aeromonas hydrophila*. Diversos autores citan cuadros similares donde aíslan *A. hydrophila*, *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* sp. y *Edwardsiella* sp. (Chowdhury y col., 2001; Majumder y col., 2001; Pal y Pradhan, 1990).

La puesta a punto de un protocolo de desafío experimental con *Aeromonas hydrophila* en *Xiphophorus hellerii* y la caracterización de las principales

alteraciones clínicas y patológicas expresadas por los peces desafiados permitirá establecer un modelo de estudio de la Septicemia por *Aeromonas* móviles en este pez tropical lo cual constituye un importante aporte en la generación de conocimiento acerca de esta enfermedad relevante para la salud humana y animal.

HIPÓTESIS

A partir del desafío experimental de peces espada (*Xiphophorus hellerii*) con *Aeromonas hydrophila* será posible desarrollar un cuadro clínico característico de Septicemia por *Aeromonas* móviles.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el cuadro clínico y patológico desarrollado en *Xiphophorus hellerii* a partir del desafío experimental con *Aeromonas hydrophila*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar un protocolo de desafío experimental con *Aeromonas hydrophila* en el pez espada (*Xiphophorus hellerii*) de manera tal de lograr reproducir un cuadro de Septicemia por *Aeromonas* móviles en esta especie.
- Describir el cuadro clínico de los animales desafiados experimentalmente mediante el registro periódico de los síntomas desarrollados por los peces.
- Caracterizar el leucograma diferencial de los animales desafiados experimentalmente en distintos instantes pos desafío.
- Describir las lesiones macroscópicas observadas a la necropsia de los peces desafiados experimentalmente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluó el efecto del desafío con *Aeromonas hydrophila* sobre la expresión de signos clínicos y el recuento diferencial de leucocitos en el pez espada (*Xiphophorus hellerii*), así como también se registraron los principales hallazgos de necropsia observados en los animales desafiados. Para ello se llevó a cabo un desafío experimental por vía intraperitoneal con una dosis bacteriana equivalente a la dosis letal cincuenta en 96 horas determinada previamente para dicho aislamiento de *A. hydrophila*. A las 8, 12 y 24 horas posdesafío 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.

Origen y mantenimiento de los peces

Se emplearon 30 ejemplares adultos de *Xiphophorus hellerii* con un peso promedio de $4,2 \pm 0,2$ gramos procedentes del bioterio del Instituto de Investigaciones Pesqueras. Dichos animales pertenecen a una línea consanguínea, lo que supone una baja variabilidad genética entre sujetos experimentales.

Se confeccionaron tres grupos de diez peces cada uno, dos grupos fueron desafiados experimentalmente y uno de ellos se empleo como control. Cada grupo fue alojado en un acuario de vidrio de 30 litros de volumen, con filtración biológico-mecánica y temperatura constante de 27 ± 1 °C. Se realizó un recambio de agua diario equivalente a un tercio del total de litros de la pecera.

Durante la experiencia de desafío los animales se mantuvieron en ayuno, únicamente se les suministroo alimento (*pellet* flotante) una vez al día para evaluar la presencia/ausencia de anorexia como síntoma asociado a la infección (el alimento fue retirado luego de evaluado el apetito de los animales).

Origen de las bacterias y confección del inóculo

Para la realización de los desafíos experimentales se empleó un aislamiento de *Aeromonas hydrophila* obtenido previamente de una epizootia de SAM registrada en un establecimiento de acuicultura con fines comerciales.

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

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 centrifugo a 3500 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 y col., 2018).

Desafío experimental

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

Registro de signos clínicos y muestreo de los animales

Los datos clínicos fueron recabados mediante observación directa de los individuos desafiados 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 12 y a las 24 horas posdesafío. 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 12 horas posdesafío se sacrificaron cuatro animales de cada uno de los grupos con la finalidad de obtener datos de necropsia y extraer sangre para realizar frotis. Se procedió de igual modo a las 24 horas posdesafío.

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.

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 tamponada. El conteo se llevó a cabo en microscopio óptico (Olympus BX50) 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.

Análisis estadístico

Se determinó la significancia estadística de las diferencias observadas en la frecuencia de signos clínicos a diferentes horas posdesafío 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%.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se presentan las frecuencias de identificación de cada uno de los signos clínicos observados en los animales desafiados experimentalmente.

Tabla 1: Frecuencia de identificación de signos clínicos en peces espada (*Xiphophorus hellerii*) a las 12 y 24 horas posdesafío experimental (PD) con *Aeromonas hydrophila*.

Signos	12 horas	24 horas	Control	Estadística
	PD	PD	(12-24 hs PD)	
Aletas congestivas	58,3 ^a	50 ^a	0 ^b	KW=22,6; p<0,01
Aletas replegadas	0	2,5	0	KW=2,5; p=0,28
Ano hemorrágico	0 ^a	37,5 ^b	0 ^a	KW=16,2; p<0,05
Ano protruído	0	2,5	0	KW=7,9; p=0,13
Anorexia	100 ^a	100 ^a	0 ^b	KW=58,0; p<<0,01
Ascitis	8,3 ^a	62,5 ^b	0 ^a	KW=26,6; p<0,01
Disnea	0	3,5	0	KW=7,9; p=0,14
Exoftalmia	0 ^a	28,5 ^b	0 ^a	KW=16,5; p<0,05
Letargia	0 ^a	37,5 ^b	0 ^a	KW=25,7; p<0,05
Nado errático	50 ^a	62,5 ^a	0 ^b	KW=19,9; p<0,01
Materia fecal con mucus	8,3	7,5	0	KW=7,5; p=0,1

^{a, b}: letras distintas indican diferencias

KW: estadístico Kruskal-Wallis

Puede apreciarse como los signos aletas congestivas, anorexia, ascitis, nado errático y materia fecal con mucus son de temprana aparición, dado que se presentan a partir de las 12 horas PD, mientras que los signos aletas replegadas, ano hemorrágico, ano protruido, disnea, exoftalmia y letargia aparecen a partir de las 24 horas PD.

A su vez se aprecia un aumento general en la frecuencia de observación de los signos clínicos a medida que avanza el tiempo, nótese lo ocurrido por ejemplo con los signos ascitis y nado errático.

En la Tabla 2 se presentan los resultados del recuento diferencial de leucocitos realizado en sangre de *X. hellerii* desafiados experimentalmente con *A. hydrophila*.

Tabla 2. Conteo diferencial de leucocitos de peces espada (*Xiphophorus hellerii*) a las 12 y 24 horas posdesafío experimental (PD) con *Aeromonas hydrophila*

Células	12 h PD	24 h PD	Control	Estadística
Linfocitos	44,2±5,9 ^a	70±8,1 ^b	91,75±10,2 ^c	KW= 6,32; p<0,05
Neutrófilos	23,6±4,2 ^a	8,0±2,1 ^b	0 ^c	KW= 6,65; p<0,05
Basófilos	14,1±3,8 ^a	20,0±2,4 ^a	0 ^b	KW= 6,65; p<0,05

Eosinófilos	5,0±2,2	0	1,45±0,9	KW= 6,32; p=0,06
Monocitos	12,1±3,2	2,0±2,9	6,8±2,6	KW= 0,57; p=0,7

^{a, b}: letras distintas indican diferencias
KW estadístico Kruskal-Wallis

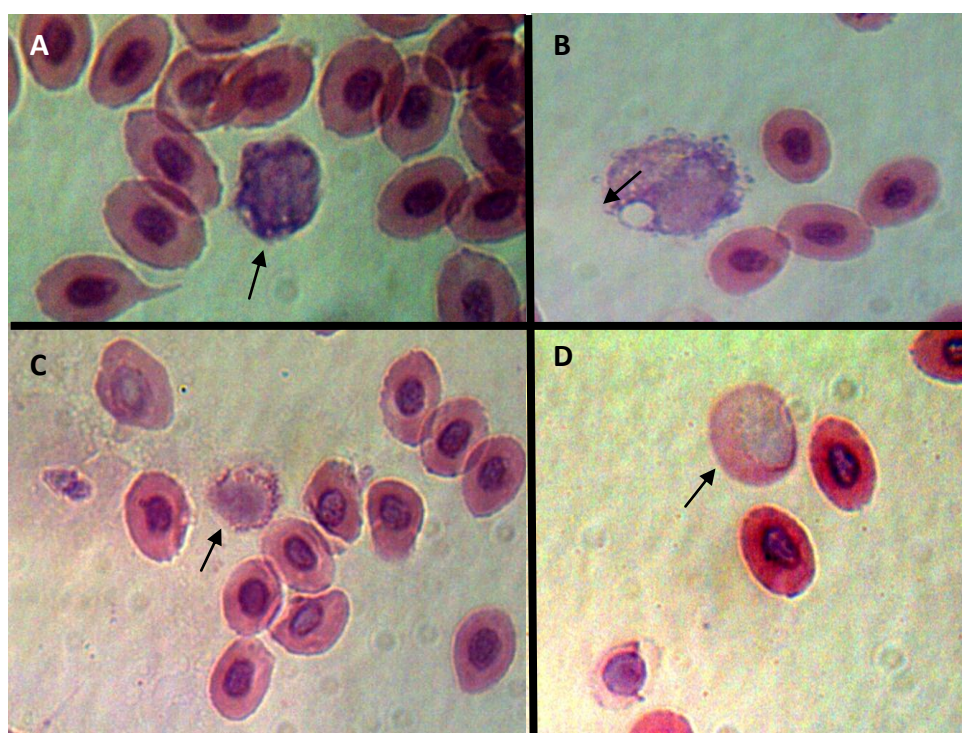


Figura 2. Células sanguíneas de *Xiphophorus hellerii*. **A.** Linfocito (flecha). **B.** Monocito (flecha). **C.** Eosinófilo (flecha). **D.** Neutrófilo (flecha).

En la Tabla 3 se presentan los principales hallazgos de necropsia realizados en los animales desafiados experimentalmente y su frecuencia de observación:

Tabla 3: Principales hallazgos de necropsia observados en *Xiphophorus hellerii* desafiados experimentalmente con *Aeromonas hydrophila*

Hallazgo de necropsia	Frecuencia de observación
Perdida de consistencia en pared abdominal	100%
Branquias pálidas	70%
Líquido serosanguinolento en cavidad abdominal	70%
Hígado friable	65%
Desprendimiento de mucosa intestinal y contenido serosanguinolento en tubo digestivo	50%
Ano protruido	50%

DISCUSIÓN

La SAM es una afección bacteriana común en peces de cultivo debido a que las bacterias involucradas en su desarrollo (*Aeromonas* spp.) suelen estar siempre presente en los ecosistemas acuáticos y actúan como patógenos oportunistas (Aoki, 1998, Bullock y col., 1971; Carnevia, 1993; Noga, 1995; Woo y Bruno, 1998).

Los signos clínicos encontrados en el desafío experimental con *A. hydrophila* llevada a cabo en el marco de ésta tesis, son similares a aquellos evidenciados en tilapias híbridas (*Oreochromis* sp.) y cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), inoculados experimentalmente tanto con somas como con PEC de *A. hydrophila*, dentro de los que se encuentran: anorexia, letargia y aumento de la frecuencia opercular con boqueo en superficie (Rey y col., 2009), signos que también han sido encontrados en desafíos naturales por *Aeromonas* móviles en tilapia (Plumb, 1997). También se realizaron hallazgos similares a los reportados por Rey y col. (2008), en desafíos experimentales, entre los que se destacan: cambios hemodinámicos sistémicos y locales como: congestión, hemorragias, ascitis, permeabilidad vascular incrementada y expulsión de fluido sanguinolento a través del ano.

Teniendo en cuenta nuestros resultados, podría especularse que la instalación de SAM en *X. hellerii* desafiados experimentalmente con *A. hydrophila* responde a un proceso progresivo que comienza por alteraciones hemodinámicas de pronta instalación (dentro de las 12 hs. PD) evidenciadas por signos tales como la ascitis y congestión de aletas. En el posterior desarrollo de la enfermedad se aprecia clínicamente el agravamiento de un cuadro digestivo que comienza con un exceso de producción de mucus dentro de las 12 horas PD y evoluciona hacia el ano hemorrágico (24 hs. PD).

Los signos comportamentales hallados en *X. hellerii* también podrían estar evidenciando la progresión de una enfermedad que se agrava con el paso de las horas. Anorexia fue el único síntoma presente en todos los animales desafiados y se evidencia desde las 12 horas PD al igual que el nado errático, posteriormente se instalan el resto de los signos comportamentales (aletas replegadas, letargia) sumados a los antes descritos.

La alteración del comportamiento provocado por éste desafío adquiere relevancia al momento de realizar tratamientos poblacionales para el control de la SAM en el pez espada. Debido a las dificultades para la implementación de tratamientos por vía parenteral en peces (carencia de presentaciones farmacológicas adecuadas para otras vías, pequeño tamaño y elevado número de animales, entre otros), el uso de alimentos medicados es una de las rutas de administración de antibióticos empleada

por los productores, lo que implica que los peces afectados, al estar anoréxicos y letárgicos no adquieren la droga para su tratamiento.

La determinación de los valores hematológicos es un importante método clínico en el diagnóstico humano (Begemann y Begemann 1989). La mayoría de estas técnicas se han adaptado para su uso en sangre de peces (Blaxhall y Daisley 1973; Lehmann y Stiirenberg 1974, 1981; Hamers 1995).

El análisis hematológico permite detectar y evaluar algunas condiciones, como son: anemia, desordenes hemostáticos y el comportamiento de algunas infecciones, entre otros (Vásquez-Piñeros y col., 2010). La determinación de los parámetros sanguíneos, la morfología y citoquímica de las células sanguíneas de los peces juega un rol importante en el diagnóstico de las enfermedades y puede reflejar a su vez alteraciones en el estatus fisiológico en relación con influencias endógenas o exógenas (Schütt y col., 1997).

Los parámetros de la sangre de *X. helleri*, como en la mayoría de los peces, muestran una variación de moderada a alta, por lo tanto es difícil de establecer "valores normales". Sin embargo, la interpretación ictiopatológica de los parámetros sanguíneos es una herramienta útil para la evaluación del estado de salud de los peces y la influencia de las condiciones de mantenimiento (Blaxhall y Daisley 1973; Hilge 1980; Lehmann y Sturenberg 1981; Hamers 1994).

En los cuadros bacterianos agudos tanto en mamíferos como en peces, la línea celular sanguínea predominante es el neutrófilo, siendo la neutrofilia y la linfopenia características en hemogramas de animales septicémicos. (Vásquez-Piñeros y col., 2010).

En nuestro caso a partir de las 12 horas PD fue posible observar disminución de linfocitos, con aumento de neutrófilos; sin verse alterada la fórmula de eosinófilos y monocitos; similar a lo observado en otros trabajos llevados a cabo en *Oreochromis* sp., (Ueda y col., 2001; Silveira-Coffigny y col., 2004).

Los linfocitos son los leucocitos más comúnmente observados en la sangre periférica de *X. helleri*. (Schütt y col., 1997) y en el presente trabajo también fue posible observarlo. La morfología celular se caracteriza por un núcleo central, redondo, un citoplasma basófilo (ver Figura 2A). Al igual que en la mayoría de otros peces (Rowley y col., 1988), los linfocitos de *X. helleri* pueden confundirse con trombocitos y eritroblastos. Sin embargo, la diferenciación es posible mediante una tinción de Ziehl.

La morfología de los monocitos macrófagos en *X. helleri* es similar a la observada en otros teleósteos, que poseen un citoplasma azul grisáceo que se describe para otros osteíctios (Rowley y col., 1988).

A diferencia de otros estudios hematológicos en los que no se ha detectado presencia de granulocitos basófilos en peces, ya sea por manchas o por tinción meta cromática, en nuestro caso se pudo encontrar un elevado porcentaje en los animales desafiados. El hallazgo de estas células en sangre de distintas especies de peces y su rol en los procesos infecciosos es discutido en la actualidad (Barberoy, 1978; Suzuki 1986; Hamers 1995).

Al igual que los eosinofilos, los basófilos muchas veces están ausentes o resultan ser escasos (Lester and Desser, 1975; Kavamoto y col. 1983; Zinkel y col, 1991; Hamers, 1995; Cannon, 2005).

Muchos autores encuentran dificultoso distinguir los neutrófilos de los eosinofilos así como los linfocitos pequeños de los trombocitos redondeados y los monocitos de los grandes linfocitos (Cannon, 2005; Canfield, 1998).

Los granulocitos eosinófilos de *X. helleri* poseen un típico núcleo excéntrico no segmentado y grandes gránulos eosinofilos. Sólo unas pocas células muestran gránulos de color rojo fuerte como un signo de fuerte eosinofilia, presentándose en nuestro estudio eosinófilos en el 5,0% de los animales a las 12 horas PD. Este tipo de células son poco frecuentes o ausentes en la sangre periférica de varias especies de peces (Cannon 2005; Kavamoto y col., 1983).

La respuesta inmune de los peces en general está bien desarrollada e integrada y en los teleósteos es donde se encuentran muchas similitudes funcionales con la respuesta observada en los vertebrados superiores. Normalmente funciona con eficiencia, aunque como cualquier otro sistema fisiológico, el sistema inmune de un individuo se ve afectado cuando el estado de salud es deficiente. En términos de una población, cuando las condiciones del medio son adversas, aumentan los riesgos de una infección y se pone en peligro la salud de todo el conjunto de ejemplares. Existen una serie de factores que influyen el desarrollo de una buena respuesta, y en algunas ocasiones la deprimen significativamente. Estos se clasifican en: factores intrínsecos o aquellos inherentes al pez como la edad y el estado sanitario, y los factores extrínsecos, como la temperatura, los cambios de estación, los parámetros abióticos del agua y las patologías (Olabuenaga., 2000).

La respuesta inflamatoria es la característica protectora del tejido en respuesta a un determinado daño y es común a todos los vertebrados, incluyendo los peces (Finn & Nielsen., 1971). La inflamación es inespecífica y puede ser iniciada por distintos factores incluyendo parásitos, bacterias o virus y otros agentes como la radiación y toxinas químicas. Los

eventos que caracterizan la respuesta inflamatoria son: 1) vasodilatación con un aumento en el flujo sanguíneo y la permeabilidad vascular, 2) exudación del plasma, y 3) migración de leucocitos a los tejidos (Ellis., 1989).

Los neutrófilos son las primeras células que migran a los tejidos y se los puede observar con frecuencia en las lesiones inflamatorias (Wolke 1975; Tyzard 1992). En el presente trabajo fue posible observar su presencia desde 12 hs PD. Su rol en estas lesiones no es muy relevante, pero ejercen una actividad extracelular liberando enzimas y radicales libres, que si bien pueden causar severos daños tisulares, colaboran con la erradicación de los patógenos presentes en el sitio de inflamación.

Otra de sus funciones estriba en la mediación de la respuesta inflamatoria aguda. A partir del pronefros, los neutrófilos pasan al torrente circulatorio y migran a los lugares de inflamación, en respuesta a estímulos quimiocinéticos, aunque este fenómeno se produce de forma más lenta que en mamíferos. Esto provoca una depleción en los neutrófilos del pronefros (Campbell y Murru, 1990; Bly y cols., 1990; Hine, 1992).

Los macrófagos mononucleares tienen un importante rol fagocítico, ingiriendo tanto material inerte como antigénico. Los linfocitos están menos asociados con lesiones inflamatorias excepto que esté involucrada una respuesta inmune mediada por células. Si el proceso inflamatorio no es efectivo para neutralizar la causa del daño o si el daño tisular continúa, puede ocurrir un encapsulamiento o enquistamiento en el área, que se acompaña por depósitos de fibras de colágeno, calcio y pigmentación (Fergusson, 1989). Los macrófagos constituyen la principal célula fagocítica en los peces, por su capacidad de ingerir y digerir material extraño, inerte o antigénico, así como restos celulares resultantes de la respuesta inflamatoria u otros procesos degenerativos (MacArthur y Fletcher, 1985; Agius, 1985; Ziegenfuss y Wolke, 1991; Blazer, 1991; Enane y cols., 1993). Al igual que los neutrófilos, también tienen gran capacidad microbicida intra y extracelular, gracias a la liberación de radicales libres durante el proceso de explosión respiratoria (Secombes y col., 1988; Plyzycz y col., 1989).

Los hallazgos postmortem realizados en el marco de ésta tesis son similares a los reportados por otros investigadores en peces desafiados natural o experimentalmente con aeromonadales móviles. Alteraciones tales como desprendimiento de mucosa intestinal y contenido sanguinolento en tubo digestivo con ano protruido, son similares a las descritas por Vásquez-Piñeros y col. (2010) y evidencian la instalación de graves trastornos digestivos a partir de la infección por éstas bacterias.

Nuestros hallazgos de necropsia fueron también similares a los reportados por Rey y col. (2008), en desafíos experimentales, destacándose los

cambios hemodinámicos sistémicos y locales como: congestión, hemorragias, ascitis y expulsión de fluido sanguinolento a través del ano.

De acuerdo a todos los resultados obtenidos se considera que los peces desarrollaron un cuadro de SAM aguda septicémica dado que existieron signos evidentes y alteraciones de patología clínica, tal como se ha demostrado en otros estudios previos de patogénesis a partir de la inoculación de *A. hydrophila* (Rey y col., 2009; Vásquez-Piñeros y col., 2010).

CONCLUSIONES

Es posible reproducir un cuadro clínico y patológico compatible con la Septicemia por aeromonadales móviles en peces espada (*Xiphophorus hellerii*) a partir del desafío experimental de *Aeromonas hydrophila* por vía intraperitoneal.

Los signos clínicos aletas congestivas, anorexia, ascitis, nado errático y materia fecal con mucus se presentan a partir de las 12 horas posdesafío experimental (PD). A las 24 horas PD aumenta la frecuencia de observación de los signos mencionados y se aprecia la aparición de nuevos signos de mayor gravedad, tales como exoftalmia y ano hemorrágico.

A las 12 horas PD se aprecia una disminución de linfocitos circulantes del 48%, acompañada por un aumento en el número relativo de neutrófilos. Estas diferencias en el leucograma diferencial con respecto al control se mantuvieron durante todo el período de experimentación (24 horas).

Los hallazgos de necropsia más característicos del desafío experimental con *A. hydrophila* en *X. hellerii* por vía intraperitoneal son: pérdida de consistencia en pared abdominal, branquias pálidas y presencia de líquido serosanguinolento en cavidad abdominal. Por otra parte se puede apreciar en menor grado la presencia de hígado friable, ano protruido, desprendimiento de mucosa intestinal y contenido serosanguinolento en tubo digestivo.

BIBLIOGRAFÍA

- Agius, C. (1985). The melano-macrophage centres of fish: A review. En: Fish Immunology. M.J. Manning y M.F. Tatner. Academic Press. Londres. pp: 85-106.
- Allan, B; Stevenson, R. (1981). Extracellular virulence factors of *Aeromonas hydrophila* in fish infection. *Can J Microbiol*; 27: 1114-1122.
- Aoki, A. (1998). Chapter 11: Motile *Aeromonas* (*Aeromonas hydrophila*) en Woo, P y Bruno, D Eds. *Fish Diseases and Disorders vol. 3: Viral Bacterial and Fungal Infections*. CABI Publishing, New York: 427-454.
- Axelrod, A.H.; Wischnath, L. (1991). *Swordtails and platies*. T.H.F. Publications Inc., New Jersey, USA.
- Blaxhall, P. C. & K. W, Daisley (1973). Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal of fish Biology* 5: 771-781.
- Blazer, V.S. (1991). Piscine macrophage function and nutritional influences: A review. *J. Aquat. Anim. Health*, 3: 77-86.
- Bly, J.E., Miller, N.W. y Clem, L.W. (1990). A monoclonal antibody specific for neutrophils in normal and stressed channel catfish. *Dev. Comp. Immunol.*, 14: 211-221
- Bullock, L.; Conroy, D.; Snieszko, F. (1971). Bacterial Diseases of Fishes in Snieszko, F. y Axelrod, H. *Diseases of fishes*. Neptune, T.F.H.Publ.Inc. : 4-141.
- Cahill, M. M. (1990). Virulence factors in motile *Aeromonas* species. *Journal of Applied Bacteriology*. 69: 1 – 16.
- Campbell, T. y Murru, F. (1990). An introduction to fish hematology. *The compendium-Small Animal*, 12: 525-533.
- Canfield, P. J. (1998). Comparative cell morphology in the peripheral blood film from exotic and native animals. *Aust. Vet. J.* 76(12): 793-800.
- Carnevia, D. (1993). *Enfermedades de los peces ornamentales*. Buenos Aires, AGROVET, 320p.
- Carnevia, D.; Letamendia, M.; Delgado, E. (2007). Infección por *Pseudomonas stutzeri* (Bacteria: Pseudomonadaceae) en *carassius auratus* (Pisces: Cyprinidae), primera cita. V Jornadas Técnicas Veterinarias, Montevideo .p106.

- Carnevia, D.; Letamendía, M.; Perretta, A.; Delgado, E. (2010) Caracterización de septicemia hemorrágica bacteriana (SHB), diagnosticadas en peces ornamentales del Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 46 (177): 27-32.
- Chacón M, Figueras G, Castro G, Soler L, Guarro J. (2003). Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. *Antonie van Leeuwenhoek* 84: 269-278.
- Chako, K.; Vineeth, R.; Jaibi, K.; Latha, C.; Nanu, E. (2006). Fish borne bacterial zoonosis. *Intas Polivet* 7(2):207-211.
- Chansue, N.; Tangtrongiros, J.; Koeypusa, W.; Wngtaratchai, J. (1999). Clinical pathological studies of goldfish with abdominal swelling syndrome. *Proceedings of 37Kasertat University Annual Conference*: 199-203.
- Chopra A, Houston C. (1999). Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. Review. *Microbes infect*; 1:1129-1137.
- Chowdhury, M.; Zahura, U.; Habib, K.; Khatun, M.; Muniruzzaman, M. (2001). Ulcer type of disease in the fishes of small-scale farmer's pond in Bangladesh. 6th Asian Fisheries Forum Book of Abstracts. p. 67.
- Cipriano RC. (2000). *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. *Fish Dis Leaflet*. 2001; 68:1-25.
- CTSA (1996). (CENTER FOR TROPICAL AND SUBTROPICAL AQUACULTURE). Bacterial diseases in Chinese catfish. Publication 122.
- Dawes, J. A. (1991). Livebearing Fishes. A Guide to Their Aquarium Care, Biology and Classification. Blandford, London, England. 240 pp.
- Dooley, J. y Trust, T. (1987). Surface Protein Composition of *Aeromonas hydrophila* Strains Virulent for Fish: Identification of a Surface Array Protein. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. 170(2):499-506.
- Ellis, A.E. (1989). The immunology of teleosts. In: Roberts, R.J. (Ed.). *Fish Pathology*. 135-152.
- Enane, N.A., Frenkel, K., O'Connor, J.M., Squibb, K.S. y Zelikoff, J.T. (1993). Biological markers of macrophage activation: applications for fish phagocytes. *Immunology*, 80: 68-72.
- Ferguson, H.W. (1989). *Systemic Pathology of Fish. A text and atlas comparative tissue response in diseases of teleost*. Iowa state University Press. Ames. pp: 5-103.

- Fijan, N. (1972). Infectious dropsy in carp- a disease complex. Diseases of fish, edited by L.E. MawdesleyThomas. Symp. Zool. Soc. Lond, 30: 39–51.
- Finn, J.P. & N.O. Nielsen. (1971). Inflammatory response in rainbow trout. J. Fish Biol. 3:463-478.
- Grizzle, J. M. & Kiryu, Y. (1993). Histopathology of gill, liver and pancreas, and serum enzyme levels of Channel catfish infected with *Aeromonas hydrophila* complex. Journal of Aquatic Animal Health 5, 36-50.
- Groff JM, Zinkl JG. (1999). Hematology and clinical chemistry of cyprinid fish. Common carp and goldfish. Vet Clin North Amer Exot Anim Pract; 2(3):741-776.
- Hamers, R. (1995). Granulation staining and cytochemistry of peripheral blood leucocytes in healthy carp (*Cyprinus carpio* L.). I. Granulocytes. Journal of Applied Ichthyology 11: 1-2, 83-93.
- Hine, P.M. (1992). The granulocytes of fish. Fish Shellfish Immunol., 2: 79-88.
- Inglis V, Roberts R, Bromage N. (1993). Bacterial diseases of fish. Blackwell Publishing. 312p.
- Jacobs, K. (1969). Livebearing Aquarium Fishes. The Macmillan Company. New York.
- Janda, J.; Duffey, S.; (1988). Mesophilic *Aeromonads* in Human Disease: Current Taxonomy, Laboratory Identification and Infectious Disease Spectrum. Reviews of infectious diseases. VOL. 10, NO.5.
- Janda, JM, Abbott SL. (2010). The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection. Clin Microbiol Rev.; 23:35-73.
- Kavamoto, E. T.; M. J. Tavares Ranzani-Paiva & M. Tokumaru (1983). Estudos hematológicos em “bagre” *Rhamdia hilarii* (Val.1840), Telosteos, no estadio de desenvolvimento gonadal maduro. Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo 10: 53-60.
- Khalil A, Mansour E. (1997). Toxicity of crude extracellular products of *Aeromonas hydrophila* in tilapia, *Tilapia nilotica*. Lett Appl Microbiol; 25: 269-273.
- Kostrzynska M, Dooley J, Shimojo T, Sakata T, Trust T. (1992). Antigenic diversity of the S-layer proteins from pathogenic strains of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromona veronii* biotype *sobria*. J Bacteriol; 174 (1): 40-47.

- Lester, R. J. G. and S. S. Desser (1975). Ultrastructural observations on the granulocytic leucocytes of the teleost *Catostomus commersoni*. *Can J. zool.* 53: 1648-1657.
- Lilley JH, Callinan RB, Chinabut S, Kanchanakhan S, Macrae IH, PHILLIPS MJ. (1998). Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS) Technical Hybook. Bangkok: The Aquatic Animal Health Research Institute.
- Loghothetis PN, Austin B. (1996). Variations in antigenicity of *Aeromonas hydrophila* strains in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, walbaum): association with surface characteristics. *Fish & shellfish immunol*; 6:455-464.
- Luderits O, Tanamoto K, Galanos C. (1984). Lipopolysaccharide: Structural principles and biological activities. *Rev. Infec. Dis*; 6:428-431.
- MacArthur, J.I. y Fletcher, T.C. (1985). Phagocytosis in Fish. En: *Fish Immunology*. M.J. Manning y M.F. Tatner. Academic Press. Londres. pp: 29-46.
- Majumder, B.; Sarker, M.; Khan, M. (2001). Incidence of ulcer type of disease in wild fishes of Bangladesh. *Bangladesh J. Fish. Res.* 5: 163-168.
- MAKAPÚ P. (1996). Bacterial Diseases in Chinese Catfish. CTSA publication center for tropical and subtropical aquaculture; 122:1-2
- Miyazaki, T., Kaige, N. (1985). A histopathological study on motile *Aeromonas* disease of crucian carp. *Fish Pathology*, 21(3): 181-185.
- Murugappan, R., Rekha S, Thirumurugan R. (2006). Characterization and quantification of siderophores produced by *Aeromonas hydrophila* isolated from *Cyprinus carpio*. *Pak J Biol Sci*; 9(3): 437-440.
- Noga, E. (1995). *Fish diseases: diagnosis and treatment*. St. Louis, Mosby.
- Olabuenaga E. (2000). Sistema inmune de peces. *Gayana* 64, 205-215.
- Pal, J.; Pradhan, K. (1990). Bacterial involvement in ulcerative condition of air-breathing fish from India. *Journal of Fish Biology*, 36:833-839.
- Paniagua, C; Rivero, O; Anguita, J y Naharro, G (1990). Pathogen city factors and virulence for rainbow trout (*Salmo gairdneri*) of motile *Aeromonas* spp. isolated from a river. *J. Clin. Microbiol.* 28(2):350-355.

- Perretta A, Antúnez K y Zunino P. (2018). Phenotypic, molecular and pathological characterization of motile aeromonads isolated from diseased fishes cultured in Uruguay. *J Fish Dis.* 40(10):1559-1569.
- Plumb J. (1997). Infectious disease of tilapia En: Costa-Pierce A, Rakocy E. *Tilapia Aquaculture in the Americas.* World Aquaculture Society. Auburn. Vol I. 212-228.
- Plyzycz, B., Flory, C.M., Galvan, I. y Bayne, C.J. (1989). Leucocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pronephros: cell types producing superoxide anion. *Dev. Comp. Immunol.*, 13: 217-224.
- Pulido, E. (1992). Factores de manejo y ambientales relacionados con las enfermedades de peces en Colombia.
- Rey, A.; Verjan, N.; Ferguson, W.; H.; Legui, C. (2009). Pathogenesis of *Aeromonas hydrophila* strain KJ99 infection and its extracellular products in two species of fish. 164, 493-499.
- Roberts, R.J. (1989). The immunology of Teleost. En: *Fish Pathology.* Baillière Tindall. London. pp: 135-150.
- Rowley, A.F., T.C. Hunt, M. Page & G. Mainwaring. (1998). Fish. In: *Vertebrate Blood Cells.* Rowley, A.F. & N.A. Ratcliffe (Eds.). Cambridge Univ Press, Cambridge. 19-127.
- Sarmiento-Soares, L.M., R.F. Martins-Pinheiro and M.M. Martinelli, (2012). A fauna de peixes nas bacias do sudeste do Espírito Santo, Brasil. *Sitientibus, Série Ciências Biológicas* 12(1):1-25.
- SCHÜTT, D.A.; LEHMANN, J.; GOERLICH, R. & HAMERS, R. (1997). Haematology of swordtail, *Xiphophorus helleri*. I: blood parameters and light microscopy of blood cells. *J. Appl. Ichthyol.*, 13:83-9.
- Secombes, C.J., Chung, S. y Jeffries, A.H. (1988). Superoxide anion production by rainbow trout macrophages detected by the reduction of ferricytochrome C. *Dev. Comp. Immunol.*, 12: 201-206.
- Silveira-Coffigny, R., A. Prieto-Trujillo & F. Ascencio-Valle. (2004). Effects of different stressors in haematological variables in cultured *Oreochromis aureus* S. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 139 (4): 245-250.
- Soltani, M.; Mirzargar, S.;Abrahimzadeh, H. (1998). Occurrence of a motil *Aeromonas septicemia* in the imported oramental fish Oscar,

- Astronotusocellatus: isolation, characterization and pathogenicity. J.Fac.Vet. Mad.Univ.Teheran 53: 63-65.
- Tamaru, C.S., B. Cole, R. Bailey, C. Brown and H. Ako, (2001). A Manual for Commercial Production of the Swordtail, *Xiphophorus helleri*. CTSA Publication Number 128. University of Hawaii Sea Grant Extension Service, Honolulu HI, 38 p.
- Teixeira Filho, A. (1976). Occurrence of the *Pseudomonas punctata* (Shaperclaus), in ornamental fish, *Carassius auratus* L. and carps, *Cyprinus carpio* L., in Brazil. BollInst. Pesca Sao Paulo 4: 37-42.
- Thune RL, Johnson MC, Graham TE, Amborski RL. (1986). *Aeromonas hydrophila* beta-Haemolysin: Purification and Examination of Its Role in Virulence in 0-Group Channel Catfish, *Ictalurus Punctatus*. J Fish Dis.; 9:55-61.
- Tizard, I. (1992). The phylogeny of the immune system. In: Veterinary Immunology an introduction. W.B. Saunders Company (Ed.). Harcourt Brace Jovanovich, Inc. USA. 457-469.
- Ueda IK, Egami MI, Sasso WS, Maushima ER. (2001). Cytochemical aspects of the peripheral blood cells of *Oreochromis (tilapia) niloticus*. Linnaeus, 1758 (Cichlidae, Teleostei): Part II. Braz J Vet Res Anim Sci ; 38: 273-277.
- Vásquez-Piñeros, M.; Rondón-Barragán, S., Restrepo-Betancur, L.; Eslava-Mocha, P.(2010). Estudio clínico y hematológico de una infección experimental con *Aeromonas hydrophila* y *Edwardsiella tarda* en tilapia, *Oreochromis* sp.
- Wedemeyer, G.A. (1996). Physiology of fish in intensive culture systems. Chapman & Hall, New York, 232 pp.
- Welcomme RL. (1988). International introductions of inland aquatic species. FAO Fisheries Technical Paper 294: 1-318.
- Wolke, R.E. (1975). Pathology of bacterial and fungal diseases affecting fish. Univ. Wisconsin Press, Madison, Wisconsin, pp. 33–116.
- Woo, P.; Bruno, D. (1998). Fish Diseases and Disorders. v3: Viral Bacterial and Fungal Infections. Walhigford, CABI Publ. 874.
- Yu, HB.; SrinivasaRao, HC.; Lee, HC.; Vilches, S.; Merino, S.; Tomas, JM y Leung, KY.; (2004). Infection and Inmunity. A Type III Secretion System Is Required for *Aeromonas hydrophila* AH-1 Pathogenesis. p 1248.

Ziegenfuss, M.C. y Wolke, R. (1991). The use of fluorescent microspheres in the study of piscine macrophage aggregate kinetics. *Dev. Comp. Immunol.*, 15: 165-171.

Zinkl, J. G.; W. T. Cox and C. S. Kono (1991). Morphology and Cytochemistry of leucocytes and thrombocytes of six species of fish. *Comparative Clinical Pathology (Historical Archive)* 1 (4): 187-195.