

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**Efecto del genotipo de virulencia de *Aeromonas* spp. (Eubacteria:  
*Aeromonadaceae*) sobre su letalidad en *Australoheros facetus*  
(Pisces:Cichlidae)**

**por**

**QUARTIANI ZUBIETA Ignacio Marcos**

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

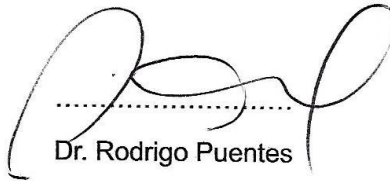
**Orientación: Higiene, inspección,  
control y tecnología de los alimentos  
de origen animal**

**MODALIDAD Ensayo Experimental**

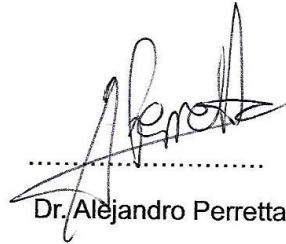
**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2022**

**PÁGINA DE APROBACIÓN**

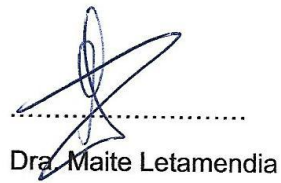
Presidente de Mesa:

  
.....  
Dr. Rodrigo Puentes

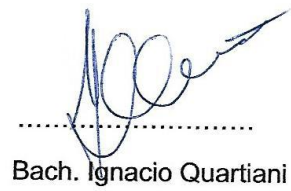
Segundo Miembro (Tutor):

  
.....  
Dr. Alejandro Perretta

Tercer Miembro:

  
.....  
Dra. Maite Letamendia

Autor:

  
.....  
Bach. Ignacio Quartiani

Fecha: 28 de diciembre de 2022

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Alejandro Perretta, por su continua disposición, dedicación y valiosos consejos, que me permitieron adquirir conocimientos durante la elaboración de este trabajo.

A los compañeros del viejo Instituto de Investigaciones Pesqueras y de la actual Unidad de Patología Biología y Cultivo de Organismos Acuáticos, los cuales me recibieron amablemente y ayudaron continuamente durante este proceso académico, y lo continúan haciendo día a día.

A la Facultad de Veterinaria, por permitirme el uso de sus instalaciones durante todos estos años, tanto de manera formativa, así como muchas veces recreativa, y principalmente por destinar-me a conocer gente muy valiosa.

A mis compañeros y futuros colegas, con los cuales compartí este camino de éxitos y sacrificios.

A los amigos que siempre están y dan para adelante.

A la familia, por su esfuerzo y apoyo incondicional, tanto a los que están, como a los que ya no y extraño todos los días.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>PAGINA DE APROBACION .....</b>	<b>2</b>
<b>AGRADECIMIENTOS... ..</b>	<b>3</b>
<b>LISTA DE TABLAS Y FIGURAS... ..</b>	<b>5</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>6</b>
<b>SUMMARY... ..</b>	<b>7</b>
<b>1. INTRODUCCION .....</b>	<b>8</b>
1.1. Generalidades de Acuicultura	
1.2. Particularidades de la Castañeta ( <i>Australoheros facetus</i> )	
1.3. Características de <i>Aeromonas</i> spp.	
1.4. Enfermedad en los Peces	
1.5. Consideraciones para la Salud Publica	
1.6. Mecanismos de patogenicidad	
<b>2. HIPOTESIS.....</b>	<b>15</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
3.1. General	
3.2. Especifico	
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
4.1. Origen y caracterización de los aislamientos	
4.2. Origen y mantenimiento de los peces	
4.3. Confección de inóculos y desafío experimental	
4.4. Análisis estadístico	
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>21</b>
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>24</b>
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>26</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>27</b>

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

### Página

Figura 1. Ejemplar de <i>Australoheros facetus</i> . tomado de: Serra S., et al. (2014).	9
Figura 2. <i>Aeromonas hydrophila</i> aislada de <i>Oreochromis niloticus</i> (Tilapia del Nilo)-tomado de El-Sayed, A. M. (2019).	11
Tabla 1. Descripción de los peces hospederos y órganos desde donde se obtuvieron los aislamientos de <i>Aeromonas</i> spp. empleados en este estudio.	17
Tabla 2. Genotipos de virulencia que poseen los aeromonadales móviles empleados en este estudio y su relación con la actividad hemolítica de los mismos.	18
Tabla 3. DL50 <sub>96</sub> estimadas a partir del modelado de los resultados obtenidos de los desafíos experimentales.	21
Figura 3. Representación gráfica de cada uno de los modelos Probit a partir de los cuales se determinó la DL50 <sub>96</sub> de los aislamientos de <i>Aeromonas</i> spp. empleados en los desafíos experimentales y sus intervalos de confianza (95%).	22
Figura 4. box-plot en el que se representa el nivel de letalidad desarrollado por distintos aislamientos de <i>Aeromonas</i> spp. (B1, H4, H9, V1 y V9) a partir del desafío experimental de <i>Australoheros facetus</i> con distintas concentraciones de los mismos (mediana, desvío estándar). No se hallaron diferencias en la letalidad entre aislamientos (estadístico Kruskal-Wallis=5.01, p=0.286)	23

## **RESUMEN**

Las bacterias del género *Aeromonas spp.*, son habitantes ubicuitarios en ambientes de agua dulce alrededor del mundo, siendo responsable de causar en peces un síndrome conocido con el nombre de Septicemia por *Aeromonas* Móviles (SAM). El avance de la acuicultura mundialmente, y los sistemas intensificados que esta emplea derivan en la concentración de grandes densidades de peces en espacio y tiempo, predisponiendo a epizootias. Nuestro país no es ajeno a ello, y en granjas productoras de esturiones se ha aislado *Aeromonas spp.*, en varias ocasiones. Dado la importancia sanitaria de esta bacteria tanto para peces de consumo como también por su potencial zoonótico, consideramos que es importante conocer aspectos de su patogenicidad que hasta el momento han sido poco estudiados. Para esto nos planteamos la hipótesis de que a mayor número de genes de virulencia menor concentración de bacteria es necesaria para determinar la dosis letal cincuenta. Teniendo en cuenta esto, nuestro objetivo general fue evaluar la sensibilidad de la castañeta (*Australoheros facetus*) ante el desafío con aislamientos de *Aeromonas spp.* con distintos genotipos de virulencia. Para esto, se confeccionaron grupos de peces a los cuales se les inoculó intraperitonealmente, diferentes concentraciones de distintos aislamientos de *Aeromonas spp.* (aislamientos B1, V1, V3, V9, P4, H9, H2). Se utilizó el modelo Probit de regresión para determinar la concentración bacteriana letal para el cincuenta por ciento de la población de peces inoculados. Se compararon las medianas de concentración letal, mediante el test estadístico de Kruskal-Wallis para estimar las diferencias entre los porcentajes de mortalidad. No se encontraron diferencias entre los distintos aislamientos evaluados. Si bien varios autores a partir del desafío experimental con esta bacteria lograron determinar la importancia del número y tipo de genes de virulencia en la letalidad, las conclusiones de nuestro trabajo indican que tanto el número como el tipo de genes de virulencia, no son determinantes de la letalidad de *Aeromonas spp.* en *Australoherus facetus* desafiados por vía intraperitoneal.

**Palabras clave:** Septicemia por *Aeromonas* Móviles (SAM). *Australoherus facetus*, dosis letal

## **SUMMARY**

Bacteria of the genus *Aeromonas* spp., are ubiquitous inhabitants in freshwater environments around the world, being responsible for causing a syndrome in fish known as Motile *Aeromonas* Septicemia (MAS). The advance of aquaculture worldwide, and the intensified systems that it uses lead to the concentration of large densities of fish in space and time, predisposing to epizootics. Our country is no stranger to this, and *Aeromonas* spp. has been isolated on several occasions in sturgeon-producing farms. Given the sanitary importance of this bacterium both for fish for consumption and also for its zoonotic potential, we consider it important to know aspects of its pathogenicity that have been little studied up to now. For this, we hypothesize that the greater the number of virulence genes, the lower the concentration of bacteria is necessary to determine the fifty lethal dose. Taking this into account, our aim was to evaluate the sensitivity of the fish *castañeta* (*Australoheros facetus*) to the challenge with isolates of *Aeromonas* spp. with different virulence genotypes. For this, groups of fish were made, which were inoculated intraperitoneally with different concentrations of different isolates of *Aeromonas* spp (isolates B1, V1, V3, V9, P4, H9, H2). The Probit regression model was used to determine the lethal bacterial concentration for fifty percent of the inoculated fish population. The lethal concentration medians were compared using the Kruskal-Wallis statistical test to estimate the differences between the mortality percentages. No differences were found between the different isolates evaluated. Although several authors from the experimental challenge with this bacterium were able to determine the importance of the number and type of virulence genes in lethality, the conclusions of our work indicate that both the number and the type of virulence genes are not determinants of mortality. the lethality of *Aeromonas* spp. in *Australoheros facetus* challenged intraperitoneally.

**Key words:** Motile *Aeromonas* Septicemia (MAS), *Australoheros facetus*, lethal dose

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Generalidades de Acuicultura:

El término “Acuicultura” refiere al conjunto de técnicas y actividades destinadas a la cría y producción de organismos acuáticos, animales o vegetales, en agua dulce, salobre o salada. Requiere del manejo de la totalidad o parte del ciclo de vida, interviniendo sobre las especies y los medios de cultivo (DINARA, 2019).

El notable crecimiento que ha tenido la acuicultura en las últimas décadas como actividad productiva se ha visto acompañado de un aumento en el empleo de sistemas intensivos de cultivo, muchos de los cuales manejan elevadas densidades de animales en sistemas cerrados con recirculación y bajo recambio de agua (Naylor y col., 2000). Desde el punto de vista sanitario, la intensificación del sistema de cultivo es considerada uno de los predisponentes principales para la aparición de epizootias (Cipriano, 2001).

En Uruguay desde principios del siglo XX se comenzó con los primeros intentos de implementar la acuicultura, en especial con especies como el pejerrey de agua dulce (*Odonthestes bonariensis*) por parte de la Facultad de Veterinaria, luego en la década del setenta, se implementa el Plan Nacional para el Desarrollo de la Acuicultura en el Uruguay, en la cual se pasa a una etapa más organizada, en donde se buscó incentivar el cultivo de especies autóctonas como el Bagre Negro (*Ramdia quelen*), posteriormente a fines de los noventa empresas de capital privado incursionan en la cría de esturiones *Acipenser baerii* (esturión siberiano) y *Acipenser gueldenstaedtii* (esturión ruso), pasando a ser los representantes de la acuicultura nacional hasta hoy en día. (Carnevia, 2008).



## 1.2 Particularidades de la Castañeta (*Australoheros facetus*)


*Australoheros facetus* (castañeta o chanchita) es un cíclido de tamaño medio, omnívoro, que habita ríos, arroyos y lagunas con abundante vegetación, siendo muy abundante en las cuencas de los ríos de La Plata, Paraná y Uruguay (región neotropical). (Teixeira de Mello, González-Bergonzoni, Loureiro, 2011).

Este pez es de fácil reproducción en cautiverio, tiene buena prolificidad (200 a 800 crías por desove) y una relativamente fácil larvicultura y crecimiento por lo que se utiliza como pez de laboratorio y como pez ornamental, (Carnevia, 2017).

Esta especie y otros representantes del género son empleados como animales de experimentación en los países donde están presentes (Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay) (Carnevia, 2007; Crupkin y col., 2013; Iturburu y col., 2017).

Además, estas características mencionadas lo transforman también en candidato para el desarrollo de su tecnología de cultivo intensivo, ya que comparte muchas características con cíclidos utilizados para tal fin como lo son las tilapias.



ORDEN:	Perciformes
FAMILIA:	Cichlidae
SUBFAMILIA:	Cichlasomatinae
ESPECIE:	<i>Australoheros facetus</i> . Jenyns, 1842.
NOMBRE COMÚN:	Castañeta.
	DISTRIBUCIÓN: Sudamérica: cuenca baja del río Paraná en Argentina, y cuencas costeras de Uruguay y Brasil. DISTRIBUCIÓN EN URUGUAY: Existen registros para todas las cuencas de nuestro país.

**Figura 1.** Ejemplar de *Australoheros facetus*. - modificado de: Teixeira de Mello, et al. (2011), Serra, et al. (2014).

La amplia distribución de este pez autóctono en los diferentes cuerpos de agua dulce de nuestro país, hacen que el contacto con agentes bacterianos ubicuitarios como lo es *Aeromonas sp* sea frecuente, y posiblemente pueda ser afectado.

Dada la disponibilidad de estos ejemplares en el bioterio de Facultad de Veterinaria, se decide utilizarlos como objeto de estudio para este ensayo, siendo algunos resultados del mismo parte de la información utilizada para la elaboración de una vacuna eficaz ante *Aeromonas spp*, que pueda ser aplicable posteriormente en la acuicultura nacional.

### **1.3 Características. *Aeromonas spp*:**

*Aeromonas* es un género de bacterias taxonómicamente clasificadas como pertenecientes a la familia *Aeromonadaceae*, compuesta por bacilos Gram negativos, aerobios facultativos, catalasa y oxidasa positivos (a excepción de *Tolumonas spp.*), siendo esta familia la más representativa dentro del orden *Aeromonadales* (clase *Gammaproteobacteria*). Estos microorganismos ubicuos, pueden ser aislados desde diferentes nichos medioambientales. (Janda y Abbott, 2010).

Este género incluye en su mayoría bacterias provenientes del medio acuático, aisladas de agua dulce y salobre, asociada a organismos acuáticos vertebrados e invertebrados, y con la facultad de ser patógenas tanto en animales como en humanos. (Martin-Carnahan y Joseph, 2005).

Existen dos grupos con características fenotípicas diferenciales dentro de este género. Uno de los grupos no posee movilidad y son psicrófilas, siendo *A. salmonicida* su representante más conocido. En cambio, existe otro grupo con facultades móviles y mesófilas, siendo *A. caviae*, *A. hydrophila*, *A. sobria* y *A. veronii*, especies clasificadas dentro de éste. Estas especies son reconocidas como agentes involucrados en el desarrollo de "septicemia hemorrágica bacteriana" ó "septicemia por *Aeromonas* móviles" (SAM), entre otras denominaciones, en varias especies de peces (Janda y Abbott, 2010, Martin-Carnahan y Joseph, 2005).

*Aeromonas hydrophila* es la bacteria más abundante en los ambientes de agua dulce de todo el mundo y es, a su vez, uno de los patógenos oportunistas más comunes en sistemas de cría piscícola (Abulhamd, 2010).

Si bien los aeromonadales móviles pueden vivir en agua salobre, la prevalencia de las mismas decrece a medida que aumenta la salinidad (Noga, 1996).

Tanto especies silvestres como especies de peces utilizados para cultivo mundialmente reconocidas como Truchas, Salmones, Carpas, Bagre de Canal,

Anguilas, y Tilapias, son susceptibles y frecuentemente afectadas por esta bacteria (Aoki, 1999).

Es destacable el creciente rol de esta bacteria como agente zoonótico, siendo responsable de infecciones intestinales, extra intestinales y de heridas principalmente (Janda y Abbott, 2010).



---

**Figura 2:** *Aeromonas hydrophila* aislada de *Oreochromis niloticus* (Tilapia del Nilo)- tomado de El-Sayed, A. M. (2019).

#### **1.4 Enfermedad en los Peces**

Como se mencionó anteriormente, en los peces esta bacteria es responsable de un síndrome conocido con el nombre de Septicemia por *Aeromonas* Móviles (SAM), la cual posee tres formas de presentación característica: la forma septicémica aguda (caracterizada por alteraciones hemodinámicas generalizadas y elevada mortandad), la forma subaguda ascítica y la forma crónica ulcerosa (Carnevia y et al., 2010).

Los brotes generalmente se asocian con un cambio en las condiciones ambientales. Diversos factores estresantes, como el hacinamiento, el bajo tenor de oxígeno, las variaciones repentinas de temperatura, o temperaturas elevadas son posibles causantes de susceptibilidad a infección. Así como también se consideran estresantes las manipulaciones que se realizan principalmente en la actividad acuícola. (Aoki, 1999).

La transmisión de la enfermedad ocurre únicamente de forma horizontal, pudiendo ser fuente de los agentes que la ocasionan las descargas del tubo digestivo de animales sanos o enfermos, sedimentos ricos en materia orgánica y heridas de animales afectados. Las soluciones de continuidad ocurridas en el epitelio por acción de ectoparásitos y micosis son puertas de entrada para el agente (Aoki, 1999).

Hasta el momento no se conocen especies de peces resistentes a este complejo bacteriano, considerándose a todos los peces de agua dulce susceptibles de contraer SAM (Aoki, 1999; Plumb y Hanson, 2011)

A pesar de la relevancia que poseen tanto *A. facetus* como *A. hydrophila* para la acuicultura de la región neotropical, no se han realizado hasta el momento evaluaciones de la sensibilidad de este pez a esta bacteria y de las respuestas del mismo ante la infección.

Por otra parte, es destacar que la SAM es la enfermedad infecciosa más prevalente en la piscicultura nacional, ya sea en peces para consumo como peces ornamentales, representando también un problema serio para la acuicultura mundial (Perretta, Antúnez y Zunino, 2018).

Es una enfermedad que presenta variados signos y en muchos casos inespecíficos. Pueden manifestarse como conductuales y a su vez presentar o no lesiones externas e internas. Los signos conductuales se presentan principalmente con anorexia, letargia, y nado errático sobre la superficie. Mientras que la sintomatología externa denota aletas congestivas a hemorrágicas, con bordes erosionados o aletas deshilachadas (Plumb y Hanson, 2011).

En Uruguay, Carnevia et al. (2010) realizaron un estudio sobre la población de peces destinados al acuarismo, con el objetivo de distinguir y detallar las posibles presentaciones de esta enfermedad. Se pudieron clasificar tres formas y se presentan a continuación en orden según su prevalencia:

-Septicémica Aguda- en la cual las hemorragias petequiales en piel y aletas, más la anorexia, letargia, opacidad de la piel, aletas replegadas y opérculos abiertos e insuficiencia respiratoria fueron los principales signos descritos.

-Subaguda Ascítica- siendo la anorexia y letargia, síntomas comunes, sumado a una ascitis característica, con lepidortosis.

-Crónica ulcerosa- caracterizada por presentar lesiones erosivas o ulcerosas en piel, de difícil cicatrización, presentando los signos conductuales comunes como letargia y deterioro general del individuo.

Esta enfermedad ha sido descrita en cultivos de varias especies de Tilapia

(*Oreochromis* spp.) alrededor del mundo (El-Sayed, 2019) presentando estos cíclidos sintomatología similar a la descrita por (Carnevia y et al., 2010), la cuál ha sido reproducida experimentalmente por Escandell y Sanchez (2017).

Para Yardimci y Aydin (2011) los hallazgos de necropsia más representativos de los animales desafiados experimentalmente fueron bazo congestivo e hígado friable, aumento de tamaño de los órganos, mucosas congestivas, gas y contenido sero-sanguinolento en el tracto gastrointestinal.

Estos hallazgos también fueron notificados por Rey, Verján, Ferguson, Iregui, (2009) en tilapias desafiadas experimentalmente con *A. hydrophila*. Según estos autores, la hemorragia e infiltración linfocitaria en varios órganos internos revela la existencia de una septicemia hemorrágica visceral.

Dado que distintas especies del género fueron aisladas en brotes ocurridos en criaderos de esturiones de nuestro país, utilizar esos aislamientos en ensayos como este es importante ya que el trasfondo del mismo es la elaboración de métodos profilácticos que puedan ayudar a prevenir los brotes de SAM en nuestro país, colaborando con la disminución del uso de antimicrobianos en la piscicultura nacional.

## **1.5 Consideraciones para la Salud Publica**

En las últimas décadas algunas especies de *Aeromonas* han emergido como un problema de salud pública, provocando infecciones intestinales y extra-intestinales. Actualmente existen tres principales especies reconocidas como patógenas para el hombre, siendo *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii biovar sobria*, responsables de un amplio rango de presentaciones clínicas, ya sea en personas sanas como en inmunosuprimidas (Janda y Abbott, 2010).

Al ser *Aeromonas* spp un microorganismo presente en un amplio rango de ambientes, lleva a que se den interacciones constantes con el hombre. La exposición a esta bacteria puede ocurrir en ambientes naturales que implican actividades productivas como la acuicultura, o actividades recreativas en medios acuáticos. A su vez por el contacto con animales silvestres, o mascotas acuáticas, como también por el consumo de agua de bebida o alimentos contaminados. (Janda y Abbott, 2010). Estos autores describen principalmente síndromes y enfermedades intestinales como gastroenteritis aguda, y extra-intestinales como retraso en la cicatrización de heridas.

## 1.6 Mecanismos de patogenicidad

Los aeromonadales mesófilos tienen la capacidad de desarrollar mecanismos de patogenicidad variados, que aún no están del todo aclarados. La ausencia de modelos animales estandarizados que permitan el estudio de la infección y las dificultades en el mantenimiento de la virulencia de las cepas en el laboratorio han ocasionado retrasos en el estudio de la patogenicidad de los microorganismos aeromonadales (Janda y Abbott, 2010).

A pesar de ello es bien conocido que las especies del género *Aeromonas* secretan un gran número de enzimas extracelulares al medio que juegan un rol vital en la ecología, sobrevivencia y patogenicidad de estos microorganismos (Pemberton y col., 1997) y a su vez es conocido el papel preponderante en la patogenia que juegan algunos elementos estructurales de los aeromonadales, como ser la capa S en el desarrollo de la forunculosis por *A. salmonicida* (Janda, 1991).

Entre los elementos que han sido identificados como posibles factores de virulencia de *Aeromonas hydrophila* se incluyen antígenos O, cápsulas, capa S, exotoxinas (como hemolisinas  $\alpha$  y  $\beta$  y enterotoxinas Act y Ast) y un repertorio de exoenzimas que digieren componentes celulares, tales como proteasas (proteasa sérica AspA, elastasa AhpB), amilasas y lipasas (Pla, Plc, Sat), ADNasas y adhesinas (pili tipo IV, flagelo polar FlaA y FlaB) entre otras (Sen y Rodgers, 2004; Yu et.al., 2004).

Varios autores postulan que la virulencia de las distintas cepas patógenas de aeromonadales móviles está directamente relacionada con el número de genes de virulencia que presenta cada genotipo en particular, siendo independiente de factores tales como la especie de *Aeromonas* de la que se trate y la identidad de los genes involucrados (Janda y Abbott, 2010).

Teniendo en cuenta la importancia sanitaria que posee este grupo bacteriano, tanto para la salud animal como para la salud humana y considerando que conocer el desempeño de los genotipos de virulencia podría ser una herramienta útil para esclarecer algunos aspectos de la patogenia de la SAM, se decide llevar a cabo esta investigación.

## 2. HIPÓTESIS

La dosis letal de *Aeromonas* spp. en *Australoheros facetus* es inversamente proporcional al número de genes de virulencia que posee el aislamiento.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo General**

Determinar la dosis letal cincuenta en noventa y seis horas (DL50<sub>96</sub>) de aislamientos de *Aeromonas* spp. con distintos genotipos de virulencia en *Australoheros facetus* desafiados experimentalmente por vía intraperitoneal.

#### **3.2 Objetivos específicos**

3.2.1. Inocular distintas concentraciones de distintos aislamientos de *Aeromonas* spp., con diversos genotipos de virulencia (aislamientos B1, H2, H9, P4, V1, V3 y V9) en ejemplares de *Australoheros facetus* por vía intraperitoneal

3.2.2. Estimar la dosis capaz de provocar la muerte al 50% de la población de peces dentro de las 96 horas post-inoculación teniendo en cuenta los registros de mortandad obtenidos a partir de los desafíos experimentales.

3.2.3. Comparar los niveles de letalidad obtenidos para cada aislamiento.



#### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluó el efecto del desafío experimental con aislamientos de *Aeromonas* spp. poseedores de diferentes genotipos de virulencia, sobre la dosis letal de los mismos, en el pez *Australoheros facetus*.

A grandes rasgos, este modelo de determinación de dosis letal se basa en inocular en los peces distintas concentraciones bacterianas por vía intraperitoneal (i.p.) y a partir del registro de mortandades observadas durante 96 horas, inferir matemáticamente la concentración de inóculo que provocaría la muerte del 50% de la población de animales, mediante el ajuste de un modelo de regresión Probit, metodología ampliamente empleada en estudios de letalidad tanto de sustancias como de microorganismos (Finney, 1947).

##### 4.1 Origen y caracterización de los aislamientos

Los aeromonadales móviles empleados en este estudio provienen de la colección de microorganismos patógenos de organismos acuáticos de la unidad académica Patología Biología y Cultivo de Organismos Acuáticos (PaBCOA) (FVet – UdelaR) y fueron obtenidos de distintas epizootias de aeromoniasis diagnosticadas en criaderos de esturiones en nuestro país. Cada uno de los aislamientos empleados en este estudio fue previamente identificado y caracterizado por métodos fenotípicos y moleculares. (Perretta et al., 2018).

En la tabla 1 se pueden apreciar los hospederos de cada aislamiento y el órgano desde donde fue obtenido el mismo.

**Tabla 1.** Descripción de los peces hospederos y órganos desde donde se obtuvieron los aislamientos de *Aeromonas* spp. empleados en este estudio

Aislamiento	Especie		Especie de esturión	
	<i>Aeromonas</i>	Nombre común	Nombre científico	Órgano
B1	<i>A. bestiarium</i>	Esturión siberiano	<i>Acipenser baerii</i>	RA
H4	<i>A. hydrophila</i>	Esturión ruso	<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	CE
H9	<i>A. hydrophila</i>	Esturión ruso	<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	RA
P4	<i>A. punctata</i>	Esturión ruso	<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	RA
V1	<i>A. veronii</i>	Esturión ruso	<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	CE
V3	<i>A. veronii</i>	Esturión siberiano	<i>Acipenser baerii</i>	RA
V9	<i>A. veronii</i>	Esturión ruso	<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	RA

CE: cerebro, RA: riñón anterior

En la tabla 2 se presentan los aislamientos de *Aeromonas* spp. que se emplearon en este ensayo experimental y el detalle de los genotipos de virulencia que cada uno de ellos posee. Dichos genotipos fueron determinados previamente, mediante la detección por PCR de los genes que codifican para las siguientes proteínas (Perretta et al., 2018):

- **act**: enterotoxina citotóxica
- **alt**: enterotoxina citotónica
- **ast**: enterotoxina citotónica
- **ela**: elastasa
- **lip**: lipasa

**Tabla 2.** Genotipos de virulencia que poseen los aeromonadales móviles empleados en este estudio y su relación con la actividad hemolítica de los mismos

Genotipos de virulencia			
#ID	Genes involucrados	Aislamientos	Actividad hemolítica
1	<i>act</i> <sup>+</sup> / <i>alt</i> <sup>+</sup> / <i>ast</i> <sup>+</sup> / <i>ela</i> <sup>+</sup> / <i>lip</i> <sup>+</sup>	B1 y H9	+
2	<i>act</i> / <i>alt</i> / <i>ast</i> / <i>ela</i> <sup>+</sup> / <i>lip</i> <sup>+</sup>	P4	-
3	<i>act</i> / <i>alt</i> / <i>ast</i> <sup>+</sup> / <i>ela</i> <sup>+</sup> / <i>lip</i> <sup>+</sup>	H4	+
4	<i>act</i> <sup>+</sup> / <i>alt</i> <sup>+</sup> / <i>ast</i> / <i>ela</i> <sup>+</sup> / <i>lip</i> <sup>-</sup>	V9	-
5	<i>act</i> <sup>+</sup> / <i>alt</i> <sup>+</sup> / <i>ast</i> / <i>ela</i> <sup>-</sup> / <i>lip</i> <sup>-</sup>	V1	+
6	<i>act</i> <sup>+</sup> / <i>alt</i> / <i>ast</i> / <i>ela</i> <sup>-</sup> / <i>lip</i> <sup>-</sup>	V3	+

B: *Aeromonas bestiarium*, H: *Aeromonas hydrophila*, P: *Aeromonas punctata*, V: *Aeromonas. veronii*.  
+ ó -: indican presencia o ausencia de actividad hemolítica respectivamente.

## 4.2 Origen y mantenimiento de los peces

Se emplearon peces de la especie *Australoheros facetus* (familia Cichliidae) provenientes del bioterio de organismos acuáticos de la unidad académica PaBCOA. Los mismos poseían una edad promedio de cuatro meses y fueron escogidos al azar de un lote de animales procedentes de un mismo desove, con un peso promedio de  $1,5 \pm 0,5$  gramos y talla promedio de  $4,2 \pm 1,0$  centímetros.

Se formaron treinta grupos experimentales de quince individuos cada uno. Cada uno de los grupos fue alojado en un acuario de 20 litros de volumen a una temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , aireación continua y filtración biológico-mecánica. Veintiocho de los grupos experimentales se emplearon para el cálculo de dosis letal (7 aislamientos x 4 concentraciones) y los restantes dos grupos constituyeron el control.

### 4.3 Confección de inóculos y desafío experimental

Se evaluaron cuatro concentraciones bacterianas diferentes para cada uno de los aislamientos, el rango de concentraciones empleado en este estudio estuvo acorde con el empleado por otros autores en varias investigaciones similares (Mittal y col., 1980; Ventura y Grizzle, 1988; Azad y col., 2001; Perretta y col., 2018).

Luego de descongelados mediante técnicas convencionales, se realizó un desafío experimental genérico en *Carassius auratus* con cada uno de los aislamientos estudiados; mediante este proceso se favorece la transcripción de genes de virulencia, por lo que el empleo de las bacterias re-aisladas de los peces desafiados podrán expresar todo su potencial patogénico.

La confección del inóculo se llevó a cabo momentos antes de iniciar la experiencia. Para ello, a partir de un cultivo puro con 24 horas de crecimiento en agar tripticosa soja (TSA) se generó una suspensión en suero fisiológico estéril hasta alcanzar una absorbancia de 0,5 a 600nm. Luego, se realizaron diluciones seriadas 1:2 hasta alcanzar las cuatro concentraciones requeridas para cada aislamiento.

La concentración bacteriana de cada inóculo se infirió a partir de conteo total de unidades formadoras de colonia por mililitro (ufc/mL) del inóculo más diluido de cada aislamiento y posterior extrapolación a las concentraciones más elevadas.

Previo al inicio de los desafíos se sembró una alícuota de cada inóculo en TSA para asegurar la viabilidad y pureza de las bacterias a inocular.

Cada concentración fue inoculada en los sujetos experimentales mediante inyección intraperitoneal. Se inyectó un volumen de 10 µL de inóculo bacteriano por gramo de pez, determinado por pesado individual al momento de la inoculación. Los grupos control recibieron el mismo volumen de PBS estéril por vía intraperitoneal.

La maniobra de pesado e inoculación de los animales se llevó a cabo bajo sedación. Para ello se empleó una solución alcohólica al 10% (v/v) de Eugenol® (Droguería Industrial Uruguay, código: 41531) a una concentración de 1mL por litro de agua en baño de inmersión según protocolo N°1647 aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) de la Facultad de Veterinaria.

Los animales inoculados fueron observados cada ocho horas para registrar mortandades, a medida que se hallaron peces muertos fueron retirados de los acuarios para no alterar la calidad del agua. Durante el tiempo que duró la experiencia se tomó como criterio de punto final la observación de alteraciones en la salud que podrían estar implicando sufrimiento para los animales y/o un claro signo de muerte inminente. Una vez finalizada la experiencia todos los animales fueron sacrificados. El sacrificio en todos los casos se llevó a cabo mediante sobredosis de anestésico en baño de inmersión (Eugenol 10%, 10mL/L a efecto).

#### **4.4 Análisis estadístico**

Para cada aislamiento se estimó la concentración bacteriana capaz de provocar la muerte en el 50% de la población de peces desafiados empleando el modelo Probit de regresión.

Se determinaron a su vez las diferencias en el porcentaje de letalidad (entendido como la frecuencia de muertes acumuladas a las 96 horas postratamiento para cada dosis de cada aislamiento) entre los aislamientos mediante comparación de medianas empleando el test estadístico de Kruskal-Wallis.

Todos los cálculos se llevaron a cabo mediante el empleo del *software* estadístico Statgraphic centurión versión 17.2. En todos los casos se empleó un nivel de confianza de 0.05.

## 5. RESULTADOS

En la tabla 3 se presentan las DL50<sub>96</sub> estimadas a partir del modelado de los resultados obtenidos de los desafíos experimentales. Obsérvese que para los aislamientos P4 y V3 no se obtuvieron valores favorables en la prueba de verosimilitud, al tiempo que la bondad de ajuste es comparativamente baja (debido a esto se identificaron con asteriscos en la mencionada tabla).

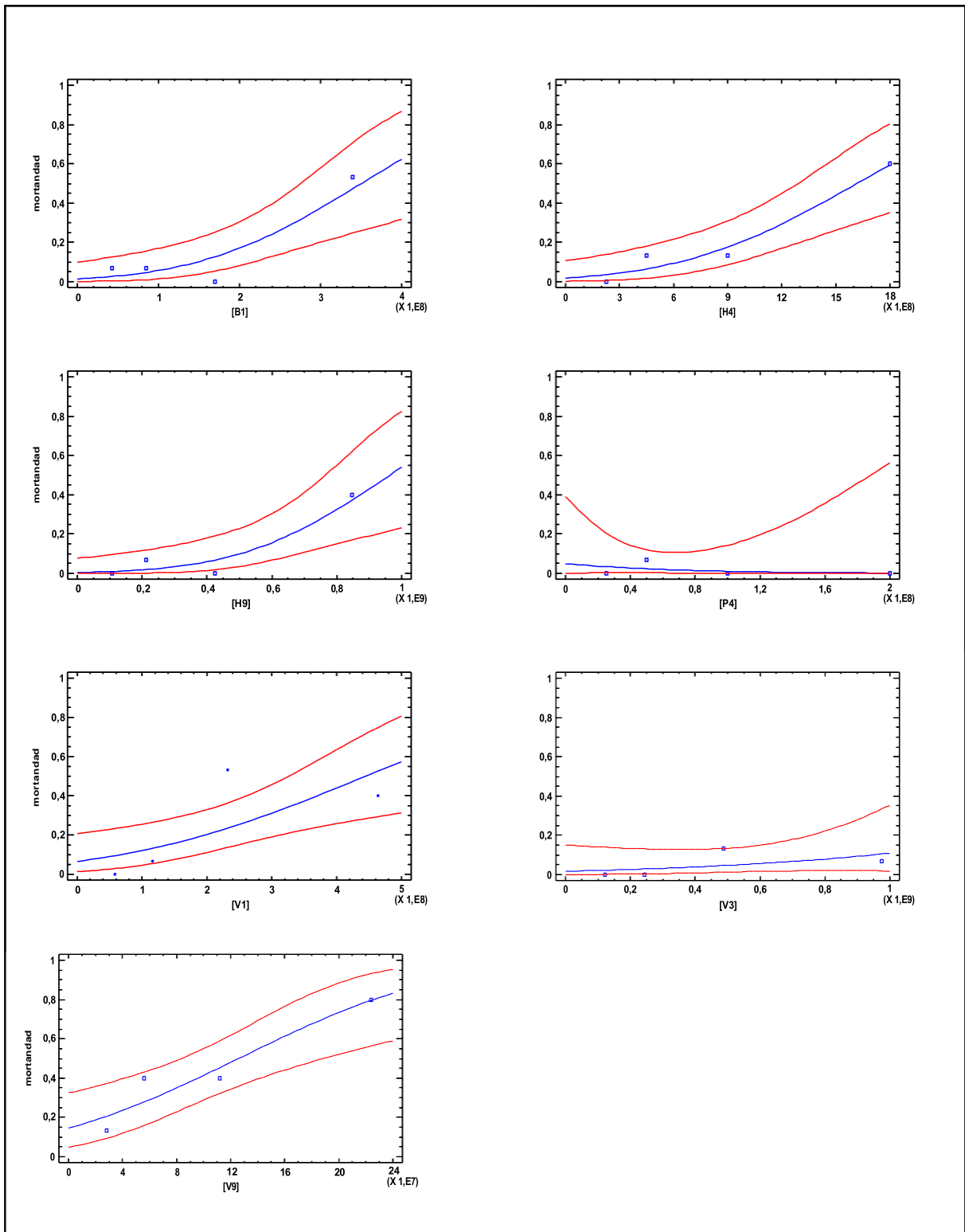
Se destaca a su vez que el modelo desarrollado para el aislamiento V1 obtuvo un p-valor en la prueba de verosimilitud que apenas supera el nivel de confianza establecido, al tiempo que su bondad de ajuste no alcanza el 50%.

**Tabla 3.** Estimaciones de dosis letal cincuenta en noventa y seis horas (DL50<sub>96</sub>) de *Aeromonas* spp. inoculadas experimentalmente en *Australoheros facetus*

Aislamiento	DL50 <sub>96</sub> estimada (ufc/mL)	Prueba de verosimilitud			Bondad de ajuste del modelo (%)
		Chi <sup>2</sup>	gl	p-valor	
B1	3.50x10 <sup>8</sup>	13.53	1	0.0002	72.6
H4	1.62 x10 <sup>9</sup>	16.78	1	0.0000	88.5
H9	9.64 x10 <sup>8</sup>	12.14	1	0.0005	77.4
P4*	-2.45E x10 <sup>8</sup>	0.6	1	0.4361	21.5
V1	4.45 x10 <sup>8</sup>	8.41	1	0.0037	43.8
V3*	2.39 x10 <sup>9</sup>	1.12	1	0.2903	23.8
V9	1.26 x10 <sup>8</sup>	13.20	1	0.0003	88.4

DL50<sub>96</sub>: dosis letal cincuenta en noventa y seis horas estimada mediante análisis de regresión Probit

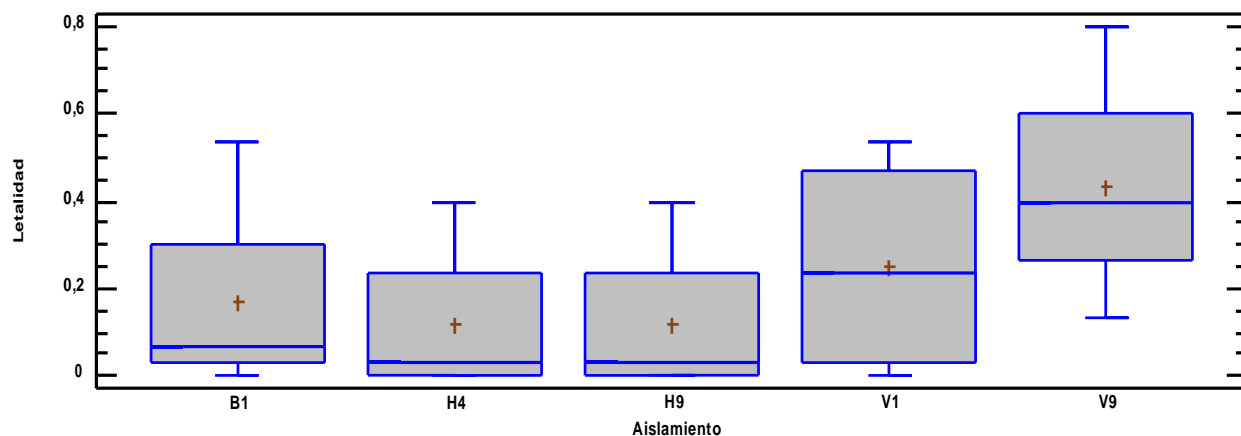
En la figura 3 se muestran las representaciones gráficas de cada uno de los modelos Probit (porcentaje de mortandad acumulada vs. concentración bacteriana) a partir de los cuales se determinó la DL50<sub>96</sub> de los aislamientos de *Aeromonas* spp. empleados en los desafíos experimentales y sus intervalos de confianza (95%).



**Figura 3.** representación gráfica de cada uno de los modelos Probit a partir de los cuales se determinó la DL50<sub>96</sub> de los aislamientos de *Aeromonas* spp. empleados en los desafíos experimentales y sus intervalos de confianza (95%).

A partir de análisis comparativo entre los porcentajes de letalidad acumulados para cada aislamiento se halló que no existen diferencias en la letalidad desarrollada a partir del desafío con cada uno de los mismos (estadístico Kruskal-Wallis=5.01,  $p=0.286$ ).

En la figura 2 se presenta el *box-plot* de las medianas del porcentaje de letalidad de cada aislamiento y su desvío estándar.



**Figura 4.** *box-plot* en el que se representa el nivel de letalidad desarrollado por distintos aislamientos de *Aeromonas* spp. (B1, H4, H9, V1 y V9) a partir del desafío experimental de *Australoheros facetus* con distintas concentraciones de los mismos (mediana, desvío estándar). No se hallaron diferencias en la letalidad entre aislamientos (estadístico Kruskal-Wallis=5.01,  $p=0.286$ )

## 6. DISCUSIÓN

La inducción experimental de SAM es una herramienta útil para relevar la virulencia de distintos aislamientos, evaluar factores predisponentes y desarrollar métodos de prevención de la enfermedad (Zhang et al., 2016). En la actualidad, la inyección intraperitoneal de bacterias vivas es el método más comúnmente empleado en el laboratorio para comparar la virulencia relativa de distintos aislamientos y la eficacia de los métodos profilácticos. Varios autores mencionan la efectividad y reproducibilidad de este método, aunque destacan a su vez, que es incongruente con el proceso natural de infección, el cual se da, por lo general por vía acuática (Hossain et al., 2014; Zhang, Pridgeon, y Klesius, 2014).

Existe amplio consenso en afirmar que la patogenia de las diferentes presentaciones clínicas de la infección por *Aeromonas* spp. es multifactorial y no puede ser explicada en función de la evaluación de algunos determinantes de virulencia (Janda y Abbott, 2010). A pesar de esto, se ha demostrado la existencia de algunos factores fundamentales para la instalación y el desarrollo de un proceso patológico.

En el caso de *Aeromonas salmonicida*, por ejemplo, se ha demostrado que la capa-S y el sistema de secreción del tipo III son indispensables en la patogenia de la forunculosis en salmónidos (Tanaka, Frenette, Charette, 2013). Sin embargo, para los aeromonadales móviles no se han hallado, hasta el momento, determinantes de patogenicidad *per se*, aunque, el grupo de toxinas conocido como aerolisina/hemolisina podría ser el factor más importante en la patogenicidad de estas bacterias (Martin-Carnahan y Joseph, 2005). Un estudio realizado por Li y et al., (2011) apoya esta teoría, dado que los aislamientos de *A. hydrophila* cuyos genotipos incluyen genes de este grupo de toxinas, son más letales para *Zebrafish* (*Danio rerio*) infectados experimentalmente.

En distintas investigaciones se ha determinado la actividad biológica de los productos de transcripción de los genes de virulencia relevados en este estudio, ya sea mediante el desafío experimental con cepas mutantes de *Aeromonas* spp. (*knock-out* para el gen de interés) o mediante el empleo de la proteína purificada (ya sea en cultivo celular o modelo animal). En todos los casos se ha demostrado que los factores de virulencia producidos provocan mortandades y/o efectos citotóxicos en distintas especies de animales (peces, ratones, nematodos) y líneas celulares (Metz, 2015).

Si bien en este estudio se relevó el efecto letal que posee un panel de solo cinco genes relacionados con factores de virulencia, en función de los resultados



obtenidos, podemos especular que la cantidad de genes no afecta la letalidad de *Aeromonas* spp. en *Australoheros facetus* desafiados experimentalmente por vía intraperitoneal.

Estos hallazgos se contraponen con los realizados por Li et al., (2011), quienes a partir del desafío experimental de *Zebrafish* (*Danio rerio*) con 26 cepas de *Aeromonas hydrophila* con siete genotipos de virulencia diferentes, concluyen que la actividad citotóxica, proteolítica y patogenicidad animal está correlacionada con el número de genes de virulencia que poseen los aislamientos y no con el tipo de gen de que se trate, debido al efecto sinérgico sobre la virulencia que poseen las proteínas expresadas.

La comparación de DL50 entre distintas investigaciones puede arrojar resultados controvertidos, debido a que las diferencias en el diseño experimental (temperatura, especie de hospedero y vía de administración, entre otros) pueden alterar de manera considerable los resultados.

A pesar de esto, Pridgeon y Klesius (2011), por ejemplo, catalogan a los aislamientos Alabama 2009 de *Aeromonas hydrophila* (AL09-71, AL09-72 y AL09-73) como extremadamente virulentos, teniendo en cuenta que la DL50 calculada para los mismos ronda las  $2,1 \times 10^5$  ufc/mL por vía intraperitoneal en bagre de canal y es varias veces menor a las dosis letales obtenidas por otro autor en tilapia nilótica.

Li y et al., (2011) por su parte, emplea el esquema presentado por Pu y colaboradores (2007), para establecer los rangos de virulencia expresados por los 26 aislamientos de *A. hydrophila* mencionados anteriormente. Según esta clasificación, se consideran virulentos aquellos aislamientos que poseen una DL50 entre las  $10^3$  y  $10^5$  ufc/mL y avirulentos aquellos aislamientos con dosis superiores a  $10^6$  ufc/mL.

Basados en los esquemas descritos anteriormente, los de *Aeromonas* spp. empleados en este estudio deberían considerarse como no virulentos, aunque deben tenerse en cuenta las salvedades de interpretación hechas previamente.

## 7. CONCLUSIONES

La dosis letal cincuenta en noventa y seis horas de *Aeromonas* spp. móviles en *Australoheros facetus* desafiados experimentalmente por vía intraperitoneal, no se ve afectada por la presencia/ausencia de los genes del genotipo *act/alt/ast/ela/lip*.

## 8. **BIBLIOGRAFÍA**

- Abulhamd, A. (2010). Genetic diversity and antimicrobial susceptibility of motile aquatic Aeromonads. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 90–95. <https://doi.org/10.7763/ijcea.2010.v1.15>
- Aoki, T. 1999. Motile Aeromonads (*A. hydrophila*). In: Fish Diseases and Disorders, Volume 3, Viral, Bacterial and Fungal Infections. Edited by: Woo, P. y Bruno, D. CABI Publishing, New York, USA. pp:874.
- Azad, I. S., Shankar, K. M., Mohan, C. V., & Kalita, B. (2000). Uptake and processing of biofilm and free-cell vaccines of aeromonas hydrophila in Indian major carps and common carp following oral vaccination-antigen localization by a monoclonal antibody. *Diseases of Aquatic Organisms*, 43, 103–108. <https://doi.org/10.3354/dao043103>
- Bailone, R. L., Fukushima, H. C., Ventura Fernandes, B. H., De Aguiar, L. K., Corrêa, T., Janke, H., Grejo Setti, P., Roça, R. D., & Borra, R. C. (2020). Zebrafish as an alternative animal model in human and Animal Vaccination Research. *Laboratory Animal Research*, 36(1). <https://doi.org/10.1186/s42826-020-00042-4>
- Carnevia, D (2008). Análisis de las oportunidades de cultivo en especies acuáticas del Uruguay. Montevideo, Dinara-FAO.p.68
- Carnevia, D.; Letamendia, M.; Perretta, A. y Delgado, E. (2010). Caracterización de septicemia hemorrágica bacteriana (SHB), diagnosticada en peces ornamentales de Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*. 46(177-180):27-32.
- 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.
- El-Sayed, A. M. (2019). *Tilapia Culture: Second Edition (2nd ed.)*. Academic Press.
- Finney, D. (1947). *Probit Analysis, a statistical treatment of the sigmoid response curve*. Cambridge, UK: Cambridge University Press
- Hossain, M. J., Sun, D., McGarey, D. J., Wrenn, S., Alexander, L. M., Martino, M. E., Xing, Y., Terhune, J. S. & Liles, M. R. (2014). An Asian Origin of Virulent *Aeromonas hydrophila* Responsible for Disease Epidemics in United States-Farmed Catfish. *mBio*, 5(3). <https://doi.org/10.1128/mbio.00848-14>

- Janda, J. M. (1991). Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus aeromonas. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(4), 397–410. <https://doi.org/10.1128/cmr.4.4.397>
- Janda, M. y Abbott, S. 2010. The Genus A.: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. *Clinical Microbiology Reviews*. 23(1):35-73.
- Li, J., Ni, X. D., Liu, Y. J., & Lu, C. P. (2011). Detection of three virulence genes alt, AHP and AERA in aeromonas hydrophila and their relationship with actual virulence to zebrafish. *Journal of Applied Microbiology*, 110(3), 823–830. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04944.x>
- Martin-Carnahan, A., & Joseph, S. W. (2005). Aeromonadales Ord. Nov.. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*, 556–587. [https://doi.org/10.1007/0-387-28022-7\\_12](https://doi.org/10.1007/0-387-28022-7_12)
- Metz, J. (n.d.). *Delineation of aeromonas hydrophila pathotypes by detection of putative virulence factors using polymerase chain reaction and nematode challenge assay*. DigitalCommons@Kennesaw State University. Retrieved November 30, 2022, from [https://digitalcommons.kennesaw.edu/integrbiol\\_etd/7/](https://digitalcommons.kennesaw.edu/integrbiol_etd/7/)
- Mittal, K. R., Lalonde, G., Leblanc, D., Olivier, G., & Lallier, R. (1980). aeromonas hydrophila in rainbow trout: Relation between virulence and surface characteristics. *Canadian Journal of Microbiology*, 26(12), 1501–1503. <https://doi.org/10.1139/m80-248>
- Naylor, R. L., Goldberg, R. J., Primavera, J. H., Kautsky, N., Beveridge, M. C., Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H., & Troell, M. (2000). Effect of aquaculture on World Fish Supplies. *Nature*, 405(6790), 1017–1024. <https://doi.org/10.1038/35016500>
- Noga, E. 1996. Fish Diseases, diagnosis and treatment. Iowa, Ed. Mosby-Year Book, Inc. USA. pp.367.
- Serra S., Bessonart, J., Teixeira de Mello F. Duarte A., Malabarba L., Loureiro M. (2014). Peces del Rio Negro. Montevideo, MGAP-DINARA. 208p.
- Pemberton, J. M., Kidd, S. P., & Schmidt, R. (2006). Secreted enzymes of aeromonas. *FEMS Microbiology Letters*, 152(1), 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10401.x>
- 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. <https://doi.org/10.1111/jfd.12864>

- Plumb, J. y Hanson, L. 2011. Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. Third Edition. Wiley-Blackwell eds. New Delhi, India. pp:492.
- Pridgeon, J. W., & Klesius, P. H. (2011). Virulence of *aeromonas hydrophila* to channel catfish *Ictalurus punctatus* fingerlings in the presence and absence of bacterial extracellular products. *Diseases of Aquatic Organisms*, 95(3), 209–215. <https://doi.org/10.3354/dao02357>
- Pu, J.; Huang, X. y Lu, C.; 2007. Virulence detection of *Streptococcus suis* Type 2 in Zebrafish. *Scientia Agricultura Sinica*. 40:2655-2658.
- Rey, A., Verjan, N., Ferguson, H.W., Iregui, C. (2009) Pathogenesis of *Aeromonas hydrophila* strain KJ99 infection and its extracellular products in two species of fish. *Veterinary Record* 164:493-499.
- Sen, K. y Rodgers, M. 2004. Distribution of six virulence factors in *A. species* isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. *Journal of Applied Microbiology*. 97:1077-1086.
- Tanaka, K. H., Frenette, M., & Charette, S. J. (2013). IS-mediated loss of virulence by *aeromonas salmonicida*. *Mobile Genetic Elements*, 3(1). <https://doi.org/10.4161/mge.23498>
- Teixeira de Mello, F; González-Bergonzoni, I. & Loureiro, M. 2011. Peces de agua dulce del Uruguay. PPR-MGAP. 188 pp
- Uruguay. Dirección Nacional de Recursos Acuáticos. (2019). Boletín Estadístico Pesquero 2018. Montevideo, MGAP-DINARA, 52 p.
- Ventura, M. T., & Grizzle, J. M. (1988). Lesions associated with natural and experimental infections of *aeromonas hydrophila* in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (rafinesque). *Journal of Fish Diseases*, 11(5), 397–407. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1988.tb00735.x>
- Yardimci, B. & Aydin, Y. (2011) Pathological findings of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).p:47-53. Ankara, Turkey.
- Yu, H., Srinivasa, P.; Lee, H.; Vilches, S.; Merino, S.; Tomas, J. y Leung, K. 2004. A Type III Secretion System Is Required for *A. hydrophila* AH-1 Pathogenesis. *Infection and Immunity*. 72(3):1248-1256.
- Zhang, D., Pridgeon, J. W. y Klesius, P. H. (2014). Vaccination of channel catfish with extracellular products of *Aeromonas hydrophila* provides protection

against infection by the pathogen. *Fish & Shellfish Immunology*, 36(1), 270–275. doi:10.1016/j.fsi.2013.11.015

Zhang, D., Xu, D.-H. y Shoemaker, C. (2016). Experimental induction of motile *Aeromonas septicemia* in channel catfish ( *Ictalurus punctatus* ) by waterborne challenge with virulent *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Reports*, 3, 18–23. doi:10.1016/j.aqrep.2015.11.003