



**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A.C.**

**Virulencia asociada a *Aeromonas dhakensis* CAIM 1873 y  
sus productos extracelulares empleando como modelo a  
híbridos de tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis  
mossambicus*)**

POR

IBQ. Jaqueline Ayala Arellano

TESIS APROBADA POR LA

**UNIDAD MAZATLAN EN ACUICULTURA Y MANEJO AMBIENTAL**

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRIA EN CIENCIA**

Mazatlán, Sinaloa

Enero del 2015

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Jaqueline Ayala Arellano, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



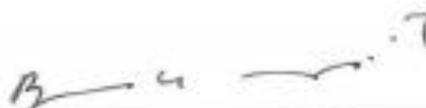
Dra. Sonia Araceli Soto Rodríguez  
Directora de Tesis



Dra. Silvia Alejandra García Gasca  
Asesora



M.C. Selene María Abad Rosales  
Asesora



Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala  
Asesor

## **DECLARACIÓN INSTITUCIONAL**

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

---

Dr. Pablo Wong González

Director General

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Consejo de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por el apoyo brindado durante el posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo por su apoyo durante mis estudios.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, especialmente a la Dra. Teresa García Gasca y al M. en C. Josué por compartir sus conocimientos sobre el cultivo celular y dedicarme parte de su tiempo durante mi estancia.

De igual manera agradezco a mi directora de tesis Dra. Sonia Soto por la dirección su colaboración para la finalización de mi tesis de maestría.

A mis asesores Dra. Alejandra, M. en C. Selene y Dr. Bruno por sus observaciones y comentarios oportunos para este trabajo.

Doy las gracias a todas las personas que participaron en el desarrollo de este trabajo: Carmen por toda su paciencia y por dedicarme siempre parte de su tiempo cuando la necesitaba, Karlita por todo su apoyo y sus consejos, July por ayudarme con la rep PCR, Selene por el apoyo brindado durante la revisión histológica de mis muestras y por su motivación durante la finalización de mi tesis.

A mis compañeros de posgrado Lorena, Marcela, Patsy, Daniela, Erick y Alejandro por todas las experiencias vividas a lo largo de esta etapa.

Especialmente agradezco a mi familia y amigos por todo su apoyo a lo largo de mis estudios, por estar conmigo en las buenas y en las malas, por alentarme siempre a seguir adelante a pesar de las dificultades por compartir mis satisfacciones en momentos de alegría, muy especialmente agradezco a mis padres quienes siempre han estado conmigo apoyándome para cumplir cada una de mis metas, por su motivación y cariño muchas gracias.

Finalmente le doy las gracias a Dios por brindarme salud y por tantas bendiciones a lo largo de mi vida.

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo está dedicado a todas las personas que han estado cerca de mí a lo largo de toda mi vida, a los que han compartido y celebrado conmigo todos mis logros, a los que me han motivado a superar cada uno de los retos y obstáculos que se me han presentado, especialmente este trabajo está dedicado a mis padres quienes me han dado todo su apoyo, comprensión y cariño para lograr cada uno de mis sueños, sin ellos nada de esto hubiera sido posible.

## CONTENIDO

I.	Introducción.....	1
II.	Antecedentes .....	5
2.1	Patogenicidad bacteriana .....	5
2.2	Factores de virulencia.....	5
2.3	Virulencia asociada a <i>Aeromonas</i> spp.....	8
2.4	Métodos para la evaluación de virulencia en cepas patógenas.....	9
	<i>In vitro</i> .....	9
	<i>In vivo</i> .....	11
2.5	Identificación bacteriana .....	12
III.	Hipótesis .....	14
IV.	Objetivos .....	15
4.1	Objetivo general.....	15
4.2	Objetivos particulares .....	15
V.	Materiales y métodos .....	16
5.1	Caracterización fenotípica de las células bacterianas. ....	16
5.1.1	Crecimiento bacteriano a diferente salinidad, temperatura y pH. ....	16
5.1.2	Pruebas de sensibilidad a antibióticos.....	17
5.1.2.1	Antibiograma .....	17
5.1.2.2	Concentración mínima inhibitoria (MIC) .....	17
5.2	Preparación de la bacteria.....	17
5.3	Obtención de productos extracelulares (PECs).....	18
5.3.1	Caracterización de los productos extracelulares. ....	19
5.3.1.1	Cuantificación de proteínas .....	19
5.3.1.2	Cuantificación de sideróforos .....	19
5.3.1.3	Actividad hemolítica.....	20
5.3.1.4	Actividad proteolítica .....	20
5.3.1.5	Actividad citotóxica .....	20
5.4	Desafíos experimentales .....	22
5.4.1	Desafío vía intraperitoneal.....	23

5.4.1.1 Células bacterianas .....	23
Aislamiento de cepas a partir de órganos de tilapias infectadas .....	24
5.4.1.2 Desafío con los productos extracelulares .....	27
5.4.1.3 Proceso histológico .....	28
5.4.2 Desafíos vía inmersión con células bacterianas y productos extracelulares .....	29
VI. Resultados.....	30
6.1 Caracterización fenotípica .....	30
6.1.1 Crecimiento de <i>Aeromonas dhakensis</i> .....	30
6.1.2 Pruebas de sensibilidad a antibióticos.....	31
6.1.2.2 Concentración mínima inhibitoria (MIC) .....	32
6.2 Factores de virulencia.....	33
6.2.1 Concentración de proteínas y actividad proteolítica de los productos extracelulares de <i>A. dhakensis</i> .....	33
6.2.2 Detección de sideróforos en los productos extracelulares de <i>A. dhakensis</i> .....	34
6.2.3 Actividad hemolítica de los productos extracelulares de <i>A. dhakensis</i> .....	34
6.2.4 Actividad citotóxica en los productos extracelulares de <i>A. dhakensis</i> ....	34
6.3 Desafíos experimentales .....	40
6.3.1. Infección vía intraperitoneal con células bacterianas de <i>Aeromonas dhakensis</i> CAIM 1873 en híbridos de tilapia .....	40
6.3.2. Infección vía intraperitoneal con productos extracelulares de <i>Aeromonas dhakensis</i> en híbridos de tilapias .....	41
6.3.3. Ensayos preliminares vía inmersión con células bacterianas y productos extracelulares de <i>A. dhakensis</i> .....	44
6.3.4 Análisis histopatológico de los órganos preservados .....	44
6.3.5 Identificación molecular del agente causal por rep-PCR .....	55
6.3.6 Tinción Gram y motilidad.....	56
VII. Discusiones .....	57
VIII Conclusiones .....	67
IX. Recomendaciones.....	69

X. Bibliografia.....70

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Antibiograma de <i>A. dhakensis</i> en agar Mueller Hinton como medio de crecimiento. a) Sulfametoxazol, b) Enrofloxacin, c) Eritromicina, d) Gentamicina, e) Oxitetraciclina, f) Norfloxacin y g) Florfenicol.....	32
Figura 2 Efecto del extracto de productos extracelulares de <i>A. dhakensis</i> sobre la sobrevivencia de células 3T3L1 a 24 h de tratamiento. Las letras minúsculas representan diferencia significativa entre los tratamientos (Tukey, $n=3$ , $p\leq 0.05$ ). El asterisco representa una diferencia significativa entre cada tratamiento y el control (Dunnett, $n=3$ , $p\leq 0.05$ ). Co: control inicial con SFB. ASB: control final con ASB. ....	35
Figura 3 Efecto del extracto de productos extracelulares de <i>A. dhakensis</i> sobre la proliferación de células 3T3L1 a 24 h de tratamiento. Las letras minúsculas representan diferencia significativa entre los tratamientos (Tukey, $n=3$ , $p\leq 0.05$ ). El asterisco representa una diferencia significativa entre cada tratamiento y el control (Dunnett, $n=3$ , $p\leq 0.05$ ). ....	36
Figura 4 La concentración letal media ( $CL_{50}$ ) calculada por regresión lineal simple entre el índice de sobrevivencia celular y el logaritmo de la concentración del extracto de PECs de <i>A. dhakensis</i> .....	37
Figura 5 La concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) se calculó por regresión lineal entre el índice de proliferación celular y el logaritmo de la concentración del extracto de PECs de <i>A. dhakensis</i> .....	37
Figura 6 Mortalidad acumulada de organismos infectados con células bacterianas de <i>A. dhakensis</i> . $n=3$ . ....	40
Figura 7. Tilapias infectadas vía intraperitoneal con células bacterianas de <i>A. dhakensis</i> . a) Zona hemorrágica en la región de la aleta pectoral y opérculo, inflamación en abdomen y erosión en aleta caudal. b) Zona hemorrágica en las aletas pélvica, pectoral y en el opérculo.....	41
Figura 8 Mortalidad acumulada de organismos infectados con productos extracelulares de <i>A. dhakensis</i> . $n=3$ . Las barras indican la desviación estándar respecto al promedio de la mortalidad. ....	42

Figura 9. Tilapias desafiadas con los PECs de <i>A. dhakensis</i> . a) Zona hemorrágica desde el opérculo hasta aleta anal. b) Hemorragia en opérculo, aleta pectoral y aleta pélvica. c) Hemorragia e inflamación del ano. ....	43
Figura 10. Bazo de un organismo control sano .....	45
Figura 11. Zona tubular del riñón de un organismo control sano.....	46
Figura 12. Corte histológico del hígado de un organismo control sano. ....	47
Figura 13. Zona del cerebro de un híbrido de tilapia control sano. ....	48
Figura 14. En la parte superior derecha (flecha blanca) se observa necrosis en forma de carrierrexis dentro del bazo y en la parte superior izquierda se encuentran núcleos picnoticos (flecha negra).....	49
Figura 15. Inflamación presente en el hígado en zona cercana a capilares sanguíneos (flechas negras).....	50
Figura 16. Necrosis en forma de carrierrexis (flecha blanca) y picnosis (flecha negra) en células sanguíneas del hígado de tilapias 6 h.p.i .....	50
Figura 17. Detección de nódulo en tejido hepático necrótico 31 h.p.i. ....	50
Figura 18. Picnosis intertubular presente en el riñón y necrosis en forma de carrierrexis 9 h.p.i .....	51
Figura 19. Necrosis en forma de picnosis en células sanguíneas del cerebro 18 h.p.i. ....	52
Figura 20. Células bacterianas de presentes en bazo de híbridos de tilapia a las 3 h.p.i. ....	52
Figura 21. Presencia de células de células bacterianas en hígado de híbridos de tilapia infectados a las 6 h.p.i. ....	53
Figura 22. Detección de células bacterianas en el riñón (cabeza) en híbridos de tilapia a las 8 h.p.i. ....	53
Figura 23. Inflamación leve presente en el hígado después de 2 h.p.i con PECs de <i>A. dhakensis</i> . ....	54

Figura 24. Carril 1 y 10: Marcador molecular. Carril 2 y 6: Riñón. Carril 3 y 7: Bazo. Carril 4 y 8: Hígado. Carril 5: Cerebro. Carril 9: control positivo A. *dhakensis*.....55

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1 Crecimiento de <i>Aeromonas dhakensis</i> CAIM 1873 a diferente salinidad, temperatura y pH. ....	31
Tabla 2 Diámetro del halo de inhibición a antibióticos de <i>A. dhakensis</i> . ....	32
Tabla 3 Determinación de la MIC utilizando diversos antibióticos que permitan inhibir el crecimiento de <i>A. dhakensis</i> . ....	33
.Tabla 4 Caracterización de las células bacterianas y productos extracelulares de <i>A. dhakensis</i> CAIM 1873. ....	39

## Resumen

La aparición de enfermedades infecciosas producidas por bacterias causan altas tasas de mortalidades. Especies de *Aeromonas* se caracterizan por poseer una variedad de factores de virulencia relacionados con su mediación en la adhesión y la invasión de los tejidos del huésped, incluyendo flagelos, fimbrias, lipopolisacáridos (LPS), proteínas de la membrana externa y productos extracelulares como hemolisinas, enterotoxinas citotóxicas y citotónicas, proteasas, lipasas, desoxirribonucleasas y sideróforos. Por lo que este trabajo se centró en primera instancia en la evaluación de virulencia de *Aeromonas dhakensis* realizando infecciones experimentales utilizando a híbridos de tilapia *Oreochromis mossambicus* x *Oreochromis niloticus* inyectándolos vía intraperitoneal (IP) con distintas dosis tanto de células bacterianas como de productos extracelulares (PECs) de *A. dhakensis*, después se aisló e identificó por rep-PCR al agente causal de las infecciones, posteriormente se evaluaron los daños histológicos bazo, cerebro, hígado y riñón de los organismos infectados. Además se caracterizó a *A. dhakensis* y se determinó su susceptibilidad ante diversos antibióticos a través de sensidiscos y de la concentración mínima inhibitoria (MIC). Se demostró que *A. dhakensis* crece entre 0.0 y 5.5% de NaCl, a un pH desde 4 a 10 y una temperatura entre los 4 y 37°C, por lo que es una bacteria con capacidad para adaptarse y desarrollarse a distintos ambientes, además es susceptible a Gentamicina y Oxitetraciclina con una MIC de 0.3 µg/ml. Por otro lado los peces infectados con dosis de  $1.55 \times 10^6$  cel/g alcanzaron una mortalidad del 79.2% a las 13 h pos infección (h.p.i) mientras que la tasa de mortalidad para los infectados con PECs fue del 100% a las 24 h. La virulencia de *A. dhakensis* se puede relacionar con la secreción de sus PECs (proteasas, sideróforos, DNAsas y actividad citotóxica) aunque los daños histopatológicos fueron mayores cuando se infectaron con células bacterianas pues al entrar al organismo se multiplican y distribuyen

circulando a través de los vasos sanguíneos superando su sistema inmune.

**Palabras clave:** *Aeromonas dhakensis*, productos extracelulares, virulencia

## Abstract

The emergence of infectious diseases caused by bacteria cause high rates of mortality. *Aeromonas* species are characterized by a variety of virulence factors related to mediation in adhesion and invasion of host tissues, including flagella, fimbriae, lipopolysaccharide (LPS), outer membrane proteins and extracellular products such as hemolysin, citotónicas and cytotoxic enterotoxins, proteases, lipases, deoxyribonucleases and siderophores. So this work focused in the first place in the evaluation of virulence of *Aeromonas dhakensis* doing experimental infections using a hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus* injecting intraperitoneally (IP) with different doses both bacterial cells and extracellular products (PECs) of *A. dhakensis*, then isolated and identified by rep-PCR the causative agent of infections later histological damage spleen, brain, liver and kidney of infected organisms were evaluated. It was also characterized *A. dhakensis* and susceptibility to various antibiotics was determined by sensidiscs and the minimum inhibitory concentration (MIC). It was shown that *A. dhakensis* grow between 0.0 and 5.5% NaCl, pH from 4-10 and a temperature between 4 and 37 ° C, which is a bacterium the ability to adapt to different environments and develop, it is also susceptible to gentamicin and oxytetracycline (MIC 0.3 mg / ml).

Furthermore infected fish at doses  $1.55 \times 10^6$  cells / g reached a mortality of 79.2% at 13 h post infection (hpi) whereas the mortality rate for infected with PECs was 100% at 24 h. The virulence of *A. dhakensis* may be related to the secretion of their PECs (proteases, siderophores, DNases and cytotoxic activity) although histopathological damage was greatest when infected with bacterial cells as to enter the body multiply and spread circulating through blood vessels exceeding your immune system up to their organs.

**Keywords:** *Aeromonas dhakensis*, extracellular products, virulence.

## I.INTRODUCCIÓN

En la actualidad uno de los principales problemas a los que se enfrenta la acuicultura es la aparición de enfermedades infecciosas de origen bacteriano (Paperna, 1996). Este tipo de enfermedades causan altas mortalidades entre los organismos lo cual genera pérdidas económicas entre el sector acuícola debido a los costos que generan los tratamientos y al descenso de la producción (Austin y Austin, 2007).

Especies del género *Aeromonas* tienen la capacidad de causar infecciones en seres humanos y peces. Se encuentran presentes comúnmente en ecosistemas acuáticos tales como agua dulce y estuarios, aguas superficiales y aguas residuales; también se encuentra en peces sanos o enfermos, productos alimenticios, heces de animales y humanas (Janda, 2001; Figueras, 2005; Martin-Carnahan y Joseph, 2005; Janda y Abbott, 2010).

La capacidad de una bacteria para desarrollar una infección depende en gran parte de la habilidad que esta pueda tener para adherirse a la superficie del huésped o de sus órganos internos o invadir sus células para evadir los mecanismos de defensa del huésped (Seshadri *et al.*, 2006, Austin y Austin, 2007; Reith *et al.*, 2008; Noonin *et al.*, 2010; Beatson *et al.*, 2011).

Las áreas que son consideradas más vulnerables para la adhesión bacteriana y la colonización son las branquias, piel y tracto gastrointestinal, así como posibles lesiones o úlceras (Jutfelt *et al.*, 2008; Noga, 2010; Figueras *et al.*, 2011b). Especies como *A. hydrophila* (Austin y Austin, 2007), *A. allosaccharophila* (Martinez *et al.*, 1992), *A. caviae* (Candan *et al.*, 1995), *A. jandaei* (Esteve, 1995), *A. sobria* (Toranzo, 1989) y *A. veronii* biovar *sobria* (Rahman, 2002) han sido relacionados con infecciones que producen septicemia y enfermedades ulcerativas y hemorrágicas en peces, causando mortalidad significativa tanto en especies de peces de agua marina como dulce (Beaz y Figueras, 2013).

Cepas patógenas de *Aeromonas* poseen una variedad de factores relacionados con su mediación en la adhesión y la invasión de los tejidos del huésped, como sus componentes estructurales incluyendo flagelos, fimbrias, lipopolisacáridos (LPS), proteínas de la membrana externa y productos extracelulares como hemolisinas, enterotoxinas citotóxicas y citotónicas, proteasas, lipasas, desoxirribonucleasas y sideróforos (Suarez y Herrera, 2012; Janda, 2001; Chaco'n *et al.*, 2003; Figueras, 2005; Yu *et al.*, 2005; Chopra *et al.*, 2009; Janda y Abbott, 2010; Figueras *et al.*, 2011b).

Recientemente en el ámbito de la taxonomía de *Aeromonas spp.* basada en la identificación molecular han llevado a una reclasificación de *Aeromonas* y a la descripción de nuevas especies (Janda y Abbott, 2010). Beaz *et al.* en el 2013 informaron de dos subespecies de *A. hydrophila*, es decir, *hydrophila* y *ranae* y propusieron una nueva clasificación de *A. dhakensis* y *A. hydrophila subsp. dhakensis* como *Aeromonas dhakensis sp.* Sin embargo *Aeromonas dhakensis* fue mal identificado originalmente como *A. caviae* y luego como *A. hydrophila*, lo cual contradice a las referencias que mencionan a *A. caviae*, *A. hydrophila* y *A. veronii bv. sobria* como los aislados de *Aeromonas* más frecuentes (Janda y Abbott, 2010; Aravena-Roman *et al.*, 2011).

*A. dhakensis* son bacilos Gram negativos, oxidasa y catalasa positiva, reducen nitrato a nitrito, resistentes al agente vibriostático O/129 (150 mg) y no producen pigmento marrón difusible. Su crecimiento ocurre en 0-3% (w/v) NaCl a una temperatura de 30 a 37°C (Beaz *et al.*, 2013). Entre sus genes de virulencia destacan pili tipo IV, toxina RTX, fimbria tipo IV, una adhesina, enterotoxina citotóxica ALT, hemolisina, fosfolipasa A1, síntesis de sideróforos, un regulador de la captación de hierro (Fur) y una invasina (Wu *et al.*, 2012)

*A. dhakensis* se distribuye ampliamente en los países cálidos (Esteve y Alcaide, 2009). Ha sido aislada a partir de agua de acuario y de peces de ornato en Portugal (Martinez *et al.*, 2011), de anguilas Europeas enfermas de agua dulce en España (Esteve *et al.*, 2012), de muestras de peces y agua en Australia (Aravena *et al.*, 2011). En México fue aislada en la presa Sanalona en Culiacán, Sinaloa a partir del ojo de una tilapia nilótica enferma (Soto-Rodriguez *et al.*, 2013). Tilapias cultivadas en todo el mundo han sido afectadas por distintas cepas bacterianas virulentas entre las que destacan *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Pseudomonas fluorescens* y *Streptococcus sp.* (Al-Harbi y Uddin, 2005; El-Sayed, 2006).

Varios estudios han evaluado los factores de virulencia asociados a especies de *Aeromonas* en tilapia *Oreochromis niloticus* (Abd-EIRhman, 2009; Téllez-Bañuelos *et al.*, 2010), bagre *Ictalurus punctatus* (Majumdar *et al.*, 2007; Ullal *et al.*, 2008), carpa común (Yin *et al.*, 2009; Jeney *et al.*, 2009) y la anguila (Esteve *et al.*, 1994), sin embargo la patogénesis de *A. dhakensis* no ha sido establecida en peces. Por lo tanto este trabajo de investigación pretende evaluar la toxicidad de las células bacterianas de *A. dhakensis* y sus productos extracelulares (PECs) y establecer la posible ruta de entrada de las células bacterianas, su distribución dentro del organismo, los efectos letales así como la descripción de las lesiones histológicas utilizando como modelo de prueba a híbridos de tilapia (*Oreochromis mossambicus* x *Oreochromis niloticus*).

La elección de híbridos de tilapia (*Oreochromis mossambicus* x *Oreochromis niloticus*) como modelo de estudio es debido a la disponibilidad de esta especie además *Aeromonas spp*, *Pseudomonas fluorescens*, y *Vibrio anguillarum* son las bacterias que comúnmente causan enfermedades en especies de tilapias por lo que los resultados de este estudio con híbridos de tilapia se acercarán a lo que realmente pasa en estos organismos al enfermarse por especies de *Aeromonas*.

## **II.ANTECEDENTES**

### **2.1 Patogenicidad bacteriana**

La patogenicidad bacteriana se relaciona directamente con las características genéticas y estructurales de los microorganismos, así como con sus mecanismos bioquímicos (Todar, 2009). Algunos mecanismos son: presencia de lipopolisacaridos, capsulas u otros componentes en su pared celular, capacidad de adherencia, secreción de sustancia intracelulares y extracelulares que le permiten al microorganismo producir daños a los tejidos provocando una enfermedad en el huésped (Todar, 2009).

Existe una relación directa y dinámica entre el huésped y el patógeno, puesto que cada uno cambia las actividades y funciones del otro. Un patógeno tiene la capacidad de invadir y colonizar los tejidos del huésped, dañar los tejidos y causar enfermedad comenzando así el proceso de infección. Este proceso comprende las etapas de entrada, adhesión, colonización, multiplicación, persistencia e infección (Salyers y Whitt, 1994).

### **2.2 Factores de virulencia**

Las propiedades que proveen a un microorganismo capacidad para infectar a un hospedero y causarle una enfermedad se conocen como factores de virulencia. Dentro de estos factores se incluyen: moléculas de superficie que median en la adhesión a la célula o tejido huésped, moléculas invasivas, mecanismos de evasión del sistema inmune y la producción de toxinas (Labella, 2001).

Los factores de virulencia pueden actuar de forma individual o interaccionando entre ellos, dándole a la bacteria patógena la capacidad para producir una enfermedad en el hospedero (Finlay y Falkow, 1997). El estudio de los factores de virulencia tiene por objetivo entender la interacción entre la bacteria patógena y su hospedero, tanto a nivel celular como molecular (Beaz y Figueras, 2013).

Al igual que otras bacterias, especies del género *Aeromonas* poseen factores de virulencia que contribuyen a la patogenicidad del huésped mediando la adhesión e invasión en sus tejidos, por ejemplo el sistema de comunicación celular (quorum sensing), sistemas de adquisición de hierro y productos extracelulares como hemolisinas, lipasas y proteasas (Janda, 2001; Chacoín *et al.*, 2003; Figueras, 2005; Yu *et al.*, 2005; Chopra *et al.*, 2009; Janda y Abbott, 2010; Figueras *et al.*, 2011b).

Los productos extracelulares (PECs) son producidos por las bacterias patógenas con el fin de facilitar la obtención de nutrientes del medio y favorecer su crecimiento, colonización y sobrevivencia dentro del organismo hospedero (Bakopoulos *et al.*, 1997). Estudios realizados recientemente han relacionado la virulencia de las bacterias patógenas en peces con la producción de exotoxinas y enzimas extracelulares que ayudan a invadir y ocasionar daño en los tejidos del organismo huésped (Pridgeon y Klesius, 2011).

Las enzimas producidas por bacterias patógenas son capaces de provocar lisis celular como las proteasas, lipasas, fosfolipasas, lecitinas y hemolisinas. Las bacterias necesitan nutrientes especiales, y las cepas virulentas poseen una habilidad especial para liberar estos nutrientes del huésped que le permiten crecer y dispersarse continuamente. La virulencia de las cepas bacterianas se ha relacionado con la producción de enzimas

degradativas como mucinasas, elastasas, lectinasas, fosfolipasas y proteasas (Soto-Rodríguez, 2002).

Toranzo y Barja (2000) señalan que la actividad enzimática asociada a los PECs de cepas patógenas para organismos acuáticos ha sido estudiada principalmente en bacterias del género *Aeromonas* y *Vibrio*. Las exoenzimas comúnmente detectadas en los PECs son las proteasas, lipasas fosfolipasas y DNAsas.

*Aeromonas* sp., como otras bacterias, secretan toxinas y enzimas, las cuales son capaces de afectar las células del hospedero y además pueden ser considerados como importantes factores de virulencia. Entre las toxinas descritas dentro de este género destacan las enterotoxinas citotóxicas y citotónicas, aerolisina y algunas hemolisinas, proteasas, fosfolipasas y DNAsas (Beaz y Figueras, 2013).

Ipsita *et al.* (2011) mostraron evidencia de la producción de una exotoxina hemolítica y proteolítica responsables de causar mortalidad en los peces al para determinar el potencial de los productos extracelulares secretados por *A. hydrophila* en carpa rohu (*Labeo rohita*).

Estudios realizados por Ellis (1998) señalan que la presencia de hemolisina en *A. salmonicida* se correlaciona con el desarrollo de la lesión y muerte rápida en la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*. Una cisteína proteasa de 94 kDa producida por *A. hydrophila* es letal para la trucha arcoiris mostrando actividad lítica-muscular, suelen degradar el moco de la superficie de los peces y provocar daños en el tejido facilitando la invasión en las células hospederas (Liu *et al.*, 2010).

Según estudios realizados por Ipsita (2011) los PECs secretados por *A. hydrophila* se consideran un factor de virulencia esencial, ya que contiene

una amplia variedad de enzimas y hemolisina que exhiben propiedades citotóxicas, citolíticas, hemolíticas y enterotóxicas que conducen a infección en peces. Subashkumar *et al.* (2006) informaron que la fracción tóxica de los PECs de *A. hydrophila* se asocia con la actividad hemolítica, mientras Sirirat *et al.* (1999) han reportado a las proteasas como principales factores de virulencia en toxicidad para los peces.

Soto-Rodriguez *et al.* (2013) indican que los productos extracelulares obtenidos a partir de *A. ichtiosmia*, *A. popoffii*, *A. veronii* y *A. dhakensis* contenían factores de virulencia, sin embargo solo la última especie de *Aeromonas* resultó patógena para *Solea vulgaris* y *Oreochromis mossambicus*.

Balebona *et al.* (1998) indican que las actividades hidrolíticas de los PECs de bacterias aisladas a partir de organismos enfermos (peces) juegan un papel importante en la virulencia durante la infección del huésped.

### **2.3 Virulencia asociada a *Aeromonas* spp.**

Especies de *Aeromonas* son conocidas por ser patógenos oportunistas para peces, y las condiciones de estrés, tales como el incremento de la temperatura, mala calidad del agua y manipulación excesiva de los peces suelen ser una causa importante en los brotes epidémicos (Hastein *et al.*, 1978; Bernoth *et al.*, 1997; Noga, 2010; Figueras *et al.*, 2011; Beaz y Figueras, 2012). El género *Aeromonas*, bacterias móviles Gram-negativas, se ha encontrado en diferentes ambientes acuáticos y se ha aislado tanto de peces sanos como enfermos, de productos alimenticios, excremento de animales y otras muestras clínicas extraintestinales y ambientales (Beaz *et al.*, 2013). Estas bacterias son probablemente las causantes de enfermedades bacterianas más comunes que afectan a tilapias silvestres y cultivadas (Beaz *et al.*, 2013).

*Aeromonas* sp son responsables de causar la septicemia por aeromonas móviles (SAM) provocando altas tasas de mortalidad en tilapias cultivadas (Pridgeon y Klesius, 2012). Los estudios han demostrado que todas las especies de *Aeromonas* móviles poseen un solo flagelo polar, el cual permite a las bacterias nadar a través de ambientes líquidos (Joseph y Carnahan, 1994; Canals *et al.*, 2007; Wihelms *et al.*, 2009). Cuando las bacterias crecen sobre ambientes viscosos tienden a desarrollar múltiples flagelos laterales que mejoran la adherencia y la formación de biopelículas (Canals *et al.*, 2007; Noonin *et al.*, 2010). Estos dos sistemas flagelares han sido estudiados en varias cepas de *A. caviae*, *A. salmonicida* y *A. hydrophila*, en donde se han identificado los genes implicados en su formación y su papel en la virulencia (Merino *et al.*, 2003; Canals *et al.*, 2007). Estudios realizados sobre la patogénesis de *A. hydrophila* han confirmado que esta bacteria se puede dispersar en forma sistemática a través de todo el pez (Rey *et al.*, 2009).

En ensayos de infección vía intraperitoneal (IP) realizados con células bacterianas y productos extracelulares de *A. dhakensis* en tilapia *Oreochromis mossambicus* se alcanzó una mortalidad del 100% en las primeras 12 h post inyección en ambos casos (Soto-Rodriguez *et al.*, 2013). Por otro lado Rey *et al.* (2009) infectando a híbridos de tilapia demostraron que la virulencia de *A. hydrophila* está relacionada con la presencia tanto de las células bacterianas como de sus productos extracelulares. Mientras que Pridgeon y Klesius (2011) en estudios con bagre observaron que la virulencia de *A. hydrophila* se debe a sus células bacterianas solamente y no a la secreción de productos extracelulares.

## **2.4 Métodos para la evaluación de virulencia en cepas patógenas.**

### ***In vitro***

La evaluación *in vitro* consiste en realizar pruebas directas sobre cepas patógenas utilizando diversos medios sintéticos que permitan identificar factores encargados de su virulencia, entre ellas están:

- Actividad hemolítica: Las hemolisinas son proteínas extracelulares citolíticas frecuentemente asociadas a *A. hydrophila* y *A. sobria*. Pertenecen al grupo de citolisinas bacterianas formadoras de poros y causantes de pérdida del contenido citoplásmico por alteración de la membrana celular (Brenden y Janda, 1987; Kozaki *et al.*, 1988).
- Actividad proteolítica: Las proteasas producen una acción patógena de lesión directa de los tejidos, facilitando así la invasividad (Sakai, 1985) además, pueden tener un efecto indirecto al activar el precursor de la  $\beta$ -hemolisina (Leung y Stevenson, 1988). Ciertas proteasas exocelulares, producidas por otras bacterias Gram-negativas, como la elastasa (33 kDa) de *Pseudomonas aeruginosa* y algunas proteasas de *Serratia marcescens* (50 y 56 kDa) tienen un papel importante en la patogenicidad (Wandersman, 1989).

*Aeromonas* spp. secreta al menos cuatro proteasas, en función del pH óptimo y la especificidad del sustrato (Nieto y Ellis, 1986). Las dos proteasas principales han sido descritas por Leung y Stevenson (1988); una de ellas es una metaloproteasa termoestable y, la otra, una proteasa termolábil dependiente de la serina.

- Actividad citotóxica: La citotoxicidad juega un papel muy importante en la patogenicidad de una cepa bacteriana, la cual viene dada por la capacidad que tenga para sintetizar distintas toxinas que provocan alteraciones letales en las células del hospedero, de acuerdo al grado de susceptibilidad de la misma a la acción de dicha toxina (Gianella, 2009). Estas alteraciones son evidenciadas por el daño estructural y morfológico que sufre la célula, induciendo en muchos casos a la muerte de esta (Parreira, 2010).
- Producción de sideróforos: El hierro es un elemento esencial para la mayoría de los organismos vivos, sin embargo éste existe formando complejos insolubles que son inaccesibles a las bacterias y para sobreponerse a tales condiciones de restricción la mayoría de los patógenos pueden expresar sistemas de transporte de alta afinidad

para obtener hierro eficientemente. Uno de ellos es la producción y secreción de sideróforos, su papel es secuestrar el hierro del medio ambiente y hacerlo disponible para la célula (Massad *et al.*, 1994).

Especies de *Aeromonas* mesófilas producen un único sideróforo que suele ser la enterobactina o la amonabactina (Massad *et al.*, 1994).

### ***In vivo***

La evaluación *in vivo* consiste en comprobar la virulencia de cepas infectando organismos vivos, preferentemente el huésped natural. Esto permite reproducir la enfermedad y los signos clínicos asociados que presentan los organismos durante la infección con la bacteria. Existen diversos métodos empleados en peces para llevar a cabo estos desafíos, entre los que destacan:

- Inmersión: Este método consiste en sumergir a los organismos en un medio líquido con una densidad bacteriana elevada por un periodo de tiempo mayor a las 12 h, lo cual permite a la bacteria interactuar con el organismo de prueba como si estuviera en su hábitat natural.
- Vía intraperitoneal (IP): Este método es considerado más directo ya que la bacteria entra directamente en el organismo de prueba a través de una inyección IP lo que asegura una dosis exacta de inyección, de esta forma es posible evaluar la virulencia de dicha bacteria (Esteve *et al.*, 1993).

Es necesario que las bacterias que se utilizan en los desafíos experimentales cumplan con los postulados de Koch, ya que estos fueron creados con el fin de determinar si el agente infeccioso aislado es el mismo que causa la enfermedad en los organismos utilizados como modelo de prueba. Los postulados de Koch son:

1. El agente patógeno debe estar presente en cada caso de la enfermedad y ausente en los sanos.

2. El agente debe ser aislado del cuerpo en un cultivo puro a partir de las lesiones de la enfermedad.
3. El agente debe provocar la enfermedad en un animal susceptible al ser inoculado.
4. El agente debe ser aislado de nuevo de las lesiones producidas en los animales de experimentación.

## **2.5 Identificación bacteriana**

Para asegurar que la bacteria inoculada en un desafío es el agente causal de la enfermedad en el huésped, es necesario cumplir con todos los postulados de Koch. En la actualidad existen diversos métodos empleados para la identificación de microorganismos utilizados en procedimientos de infección *in vivo*, uno de ellos es la técnica de rep-PCR. Este procedimiento se basa en la presencia de secuencias repetitivas presentes en casi todas las especies de bacterias que pueden ser utilizadas como secuencias de consenso para la hibridación de cebadores (iniciadores) que inician la amplificación en estos sitios. Estas secuencias se ubican típicamente en varios sitios del genoma bacteriano, así cuando dos secuencias repetidas son localizadas una cerca de la otra, la región flanqueada puede ser efectivamente amplificada. Para esto se han utilizado principalmente secuencias repetitivas extragénicas palindrómicas, identificadas en muchos miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (Van *et al.*, 1999).

Aunque esta técnica ha sido ampliamente utilizada para examinar la diversidad entre microorganismos procariontes, la rep-PCR también es aplicable a estudios de evolución y ecología microbiana, ya que tiene el poder de diferenciar microorganismos a nivel cepa o aislado (Ishii y Sadowski, 2009).

La técnica de amplificación de elementos repetitivos, conocida como rep-PCR ha demostrado ser una herramienta valiosa para identificar, rastrear y analizar la diversidad de microorganismos médica y ambientalmente

importantes (Versalovic *et al.*, 1994; Gómez-Gil *et al.*, 2004). La rep-PCR de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos empleando el iniciador (GTG)<sub>5</sub> diseñado para hibridar con secuencias repetidas intercaladas en el genoma ha sido reconocida como una técnica taxonómica simple que se caracteriza por tener un alto poder discriminatorio, bajo costo y alto rendimiento con un gran número de aislados demostrando ser una herramienta confiable para la clasificación e identificación procedente de diversas fuentes (Álvarez, 2006; Gómez-Gil *et al.*, 2004).

En 2004 se llevó a cabo un estudio por Szczuka y Kaznowski utilizando la rep-PCR para reconocer la relación clonal de cepas de *Aeromonas* derivadas de muestras de heces de seres humanos de diferentes áreas geográficas.

García *et al.* (2010) encontraron heterogeneidad genética entre las cepas de *A. salmonicida subsp. salmonicida* aisladas de diferentes especies de peces. Sin embargo, también observaron un clon predominante que era responsable de la mayoría de los brotes de forunculosis en el pez.

En estudios realizados por Brandi *et al.* (1996) se determinó la similitud genética entre las cepas aisladas de peces sanos y enfermos (*R. rutilus*) tomados del mismo lago, y se encontró que el aislado *A. veronii* biotipo *sobria* eran diferentes clones. Estos resultados revelaron que los clones de *Aeromonas* sp. implicados en las infecciones de peces no mostraron una similitud genética estrecha con clones aislados a partir de muestras de agua del lago, por lo que se reveló la coexistencia de diversos clones de *A. veronii* biotipo *sobria* en el agua de este lago.

### III.HIPÓTESIS

La virulencia de *Aeromonas dhakensis* CAIM 1873 utilizando a híbridos de tilapia (*O. mossambicus* x *O. niloticus*) como modelo de prueba está directamente relacionada con la secreción de sus productos extracelulares (hemolisinas, proteasas, sideróforos y enterotoxinas).

## IV.OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Evaluar la virulencia y los daños histopatológicos que causan las células bacterianas y los productos extracelulares de *Aeromonas dhakensis* CAIM 1873 en híbridos de tilapia *Oreochromis mossambicus* x *Oreochromis niloticus*.

### 4.2 Objetivos particulares

- Caracterizar fenotípicamente las células bacterianas de *A. dhakensis* CAIM 1873 y sus productos extracelulares.
- Evaluar la toxicidad de las células bacterianas de *A. dhakensis* CAIM 1873 y sus productos extracelulares en juveniles de híbridos de tilapia *Oreochromis mossambicus* x *Oreochromis niloticus*.
- Evaluar los daños histopatológicos en juveniles de híbridos de tilapia infectados con células bacterianas de *A. dhakensis* cepa CAIM 1873 y sus productos extracelulares

## V.MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Caracterización fenotípica de las células bacterianas.

#### 5.1.1 Crecimiento bacteriano a diferente salinidad, temperatura y pH.

La cepa CAIM 1873 fue sembrada en agar de soya tripticasa (TSA) e incubada a 30°C por 24 h. Después se preparó un inóculo en 10 ml de agua destilada estéril a partir de la siembra obtenida en TSA hasta lograr una turbidez del estándar 0.5 de McFarland, esta turbidez equivale a una densidad del inóculo bacteriano de  $1 \times 10^8$  UFC/ml. Posteriormente se realizaron tres ensayos, con cinco replicas cada uno y se hicieron observaciones por 7 días reportando el crecimiento como (+) y ausencia como (-).

En el primer ensayo se inocularon tubos con 5 ml de TSB (caldo de soya tripticasa) ajustados a salinidades de 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5 y 10% con 100 µl de la suspensión bacteriana preparada previamente. Los tubos con TSB ajustados a una salinidad del 0% se prepararon basándose en su fórmula original sin agregar cloruro de sodio.

En el segundo ensayo se inocularon tubos con 5 ml de TSB ajustados a pH de 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 con 100 µl de la suspensión bacteriana preparada y se incubaron a 37 °C por 7 días. El pH fue ajustado con NaOH 0.1 M o HCl 0.1 M para acidificar o alcalinizar la solución, respectivamente. Por último, para el tercer ensayo, la suspensión bacteriana preparada previamente fue sembrada por estría en placas de TSA e incubada a temperaturas de 4, 20, 37 y 40 °C por 7 días.

## **5.1.2 Pruebas de sensibilidad a antibióticos**

### **5.1.2.1 Antibiograma**

Para determinar la susceptibilidad de *Aeromonas dhakensis* CAIM 1873 a diferentes antibióticos, la cepa fue sembrada en TSB a 30°C por 24 h. Con un hisopo estéril se tomó una muestra del inóculo y se sembró en agar Mueller Hinton, después se colocaron los sensidiscos con diferentes tipos de antibióticos, posteriormente fueron incubadas durante 24 h a 30°C. Los sensidiscos fueron preparados previamente con papel de alta calidad (6 mm) impregnándolo con cantidades exactas de antibióticos, se consideró cada antibiótico como un tratamiento que se realizó por triplicado. Los antibióticos utilizados fueron Norfloxacin (30 µg), Enrofloxacin (2 µg), Gentamicin (10 µg), Florfenicol (5 µg), Oxitetraciclina (10 µg), Eritromicina (5µg) y Sulfametoxazol (10µg), todos los antibióticos utilizados fueron de marca Sigma. Después de la incubación se midieron los halos de inhibición formados alrededor de cada disco.

### **5.1.2.2 Concentración mínima inhibitoria (MIC)**

Para evaluar la concentración más baja de un antibiótico que inhibe el crecimiento de *Aeromonas dhakensis* CAIM 1873, la cepa se sembró en agar TSA y se incubó a 30°C por 24 h. A partir de ese crecimiento se preparó una suspensión bacteriana en agua destilada hasta obtener una turbidez de 0.5 McFarland (equivalente a  $1 \times 10^8$  UFC/ml). Luego se prepararon tubos con 5 ml de caldo Mueller Hinton a concentraciones de 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 mg/ml de cada uno de los antibióticos probados: gentamicina, oxitetraciclina, sulfametoxazol, eritromicina, enrofloxacin, florfenicol y norfloxacin por triplicado. Cada tubo se inoculó con 100 µl de la suspensión bacteriana preparada previamente y se incubaron durante 24 h a 30°C.

## **5.2 Preparación de la bacteria**

*Aeromonas dhakensis*, cepa CAIM 1873, fue obtenida de la colección de microorganismos de importancia acuática (CAIM, CIAD Mazatlán), fue aislada de un ojo de una tilapia enferma cultivada en jaulas flotantes en la

presa Sanalona ubicada al noroeste de Sinaloa a 24 km del municipio de Culiacán, en México (Soto-Rodríguez *et al.*, 2013).

Le cepa CAIM 1873 *Aeromonas dhakensis* fue reactivada de su criopreservación a -80 °C por inoculación en 5 ml de caldo de soya tripticasa (TSB) e incubación toda la noche a 30°C sin agitación. Posteriormente se reinocularon 100 µl de este caldo bacteriano en 10 ml de TSB y se incubó durante la noche a 30°C.

### **5.3 Obtención de productos extracelulares (PECs)**

Para obtener los productos extracelulares de la cepa CAIM 1873 se utilizó una técnica de extracción en medio sólido descrita por Zhang y Austin (2000), en donde se prepararon placas con 20 ml de TSA. El inóculo bacteriano se preparó incubando la bacteria toda la noche en 10 ml de TSB a 30°C. Se tomó 1 ml del inóculo y se colocó en cada placa previamente preparada empleando un rastrillo de vidrio estéril, las cuales se cubrieron con un papel celofán dulce estéril. Las placas se incubaron a 30°C durante 24 h, las membranas se lavaron con 7 ml de buffer fosfato salino (PBS) estéril, con pH de 7.2.

El producto obtenido del lavado se centrifugó a 8500 rpm durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se filtró a través de membranas estériles de celulosa 0.22 µm de diámetro de poro para poder remover las células bacterianas. Los productos del filtrado fueron sometidos a pruebas de esterilidad para comprobar que no hayan quedado células bacterianas viables, sembrando 100 µl en placas con agar TSA y TCBS e incubando a 30°C por una noche. Se realizaron alícuotas de 1 ml de los PECs extraídos y se almacenaran a -20°C hasta su uso.

### **5.3.1 Caracterización de los productos extracelulares.**

#### **5.3.1.1 Cuantificación de proteínas**

La cuantificación de la concentración de proteínas presente en los PECs obtenidos se realizó mediante el método de Bradford (1976). Se utilizó seroalbúmina de bovino como estándar para elaborar una curva de calibración empleando concentraciones de 0, 0.1, 0.2, 0.3 y 0.4  $\mu\text{g/ml}$  por triplicado de seroalbúmina de bovino. Posteriormente se tomaron 100  $\mu\text{l}$  de cada concentración de seroalbúmina de bovino, así como de la muestra de PECs y un control (agua destilada) y se les añadieron 5 ml del reactivo de Bradford. Las muestras se homogeneizaron durante 5 minutos y se midió la absorbancia a 595 nm. Los valores que se obtuvieron de absorbancia a partir de la curva de calibración fueron ajustados a una recta para realizar el cálculo de concentración de proteína total ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) de la muestra de PECs.

#### **5.3.1.2 Cuantificación de sideróforos**

Para la determinación cuantitativa de sideróforos se utilizó el medio caldo casaminoácidos (CAS) (5 g de casaminoácidos, 1g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , y 0.25 g de  $\text{MgSO}_4$  por litro) (Meyer, 1999).

Se prepararon 3 tubos con 10 ml del medio CAS, se inocularon con 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión bacteriana de *A. dhakensis* ajustada a una densidad celular de  $10^8$  UFC/ml y se incubaron en agitación durante 48 h a 30°C. Posteriormente se midió la absorbancia a 595 nm para conocer la densidad celular, después se centrifugó a 5000 rpm a 4°C por 10 minutos para eliminar las células bacterianas y se midió la absorbancia a 405 nm en el sobrenadante para cuantificar los metabolitos del tipo sideróforos. La concentración fue expresada en  $\mu\text{M}$  de sideróforos por  $10^8$  UFC/ml de bacteria correspondiente a una turbidez del 0.5 de la escala de McFarland.

#### **5.3.1.3 Actividad hemolítica**

Para la determinación de la actividad hemolítica en los productos extracelulares se utilizaron placas de agar sangre suplementado con 5% de eritrocitos de oveja (Dibico). Se utilizaron dos métodos, cada uno realizado por triplicado: en el primero se hicieron orificios sobre las placas (2x1 cm) y se inocularon con 5 µl de PECs, en el segundo método se inocularon 100 µl de PECs sobre las placas de agar sangre y se distribuyó por toda la caja con un rastrillo estéril. En ambos casos las placas fueron incubadas durante 48 h a 37°C. Una zona decolorada alrededor de las colonias indica la presencia de actividad hemolítica (Gerhardt *et al.*, 1981).

#### **5.3.1.4 Actividad proteolítica**

La actividad proteolítica de los PECs se determinó utilizando el método colorimétrico, basado en la utilización del sustrato azocoll (Sigma) (Chavira *et al.*, 1984). Este método consiste en tomar 2.5 ml de buffer Tris-HCl 0.1 M agregar 0.02 g de azocoll y 100 µl de PECs e incubar la reacción a 37°C durante 30 min. Posteriormente la reacción se detuvo al agregar 2.5 ml de la solución acuosa de ácido tricloroacético al 10%. Por último se centrifugó a 1000g durante 15 min a 4 °C y se midió la absorbancia del sobrenadante a 520 nm. Una absorbancia de 1.0 a 520 nm equivale a una unidad de actividad proteolítica.

#### **5.3.1.5 Actividad citotóxica**

Para la determinación de citotoxicidad los productos extracelulares de *A. dhakensis* primero fueron liofilizados en una liofilizadora marca Labconco modelo 7382041 la línea celular que se utilizó 3T3L1, L1 es una subcepa continua de 3T3 desarrollada a través del aislamiento clonal. 3T3L1 es una línea celular derivada a partir de células embrionarias de ratón adquirida de la ATCC (American Type Culture Collection). Esta línea celular es un

hospedero de transfección ya que es utilizada para la inserción de genes externos que puedan expresarse dentro de estas células.

Las células 3T3L1 se sembraron a una densidad de  $3 \times 10^4$  células por pozo en placas de 24 pozos con DMEM (Medio de Eagle modificado de Dulbecco, Gibco) adicionado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Promega®). El cultivo se mantuvo a 37°C en atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5% en una cámara de gasificación (Nalgene modelo 5317-0120). Después de 24 h, las células se sensibilizaron cambiando el medio por DMEM adicionado con 2% de SFB.

El SFB es el suplemento de crecimiento más empleado para el cultivo celular pues posee un alto contenido de factores no definidos que promueven el crecimiento satisfaciendo los requerimientos metabólicos para el cultivo celular, este suplemento permite a las células crecer más rápido y en mayor cantidad, utilizándose de esta manera como suplemento principal en el cultivo celular.

Después de 48 h al llegar a una confluencia celular entre el 80-100% se cambió el medio por DMEM adicionado con 0.5% de albúmina sérica de bovino (ASB) y diferentes concentraciones del extracto liofilizado de productos extracelulares partiendo de 0.1 a 10 mg de extracto por mililitro del medio DMEM con 0.5% de ASB. 24 h después se cuantificó el número celular utilizando tripsina para remover las células. El conteo se realizó con una cámara de Neubauer, observando las células a través de un microscopio invertido marca Zeiss modelo Vert A1 (García-Gasca *et al.*, 2002).

Las tasas de proliferación mínima y máxima se calcularon mediante la comparación con dos tratamientos control preparados con DMEM adicionado con 0.5% de ASB y DMEM al 10% de SFB, respectivamente.

El número de células se estimó con base en los siguientes cálculos:

$$\text{Número de células total por pozo} = \frac{N}{C} \times (1 \times 10^4)(V) \quad (1)$$

En donde:

$N$  Es el número de células contadas

$C$  Número de campos contados en la cámara de Neubauer

$1 \times 10^4$  Es el factor de volumen de la cámara de Neubauer

$V$  Volumen en ml de la suspensión celular. El índice de proliferación se calculó respecto a las células mantenidas en ASB al 0.5% y el índice de sobrevivencia respecto a las células contadas al inicio del experimento (control inicial al cambio de condiciones o sensibilización). Se estimó la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) para definir la cantidad de extracto liofilizado de PECs necesario para inhibir el 50% del crecimiento celular y la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) para determinar la cantidad de extracto necesario para eliminar el 50% del crecimiento celular. Todos los experimentos se realizaron por duplicado (García-Gasca *et al.*, 2002).

El índice de proliferación se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\% P = \frac{\text{Número de células en el tratamiento}}{\text{Número de células del control en ASB al 0.5\%}} \times 100 \quad (2)$$

El índice de sobrevivencia se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\% S = \frac{\text{Número de células en el tratamiento}}{(\text{Número de células del control inicial})} \times 100 \quad (3)$$

## 5.4 Desafíos experimentales

### Aclimatación y mantenimiento de las tilapias

Los híbridos de tilapia *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus* se mantuvieron en tanques de 600 L de agua dulce con aireadores, cada uno contenía aproximadamente 500 organismos. Los recambios de agua se

realizaban una vez a la semana con agua potable filtrada. Su alimentación consistió en una dieta comercial con un contenido proteico del 33% dos veces al día *ad libitum*.

### **Preparación del inóculo**

La cepa CAIM 1876 de *A. dhakensis* fue inoculada en 10 ml de TSB por 24 h a 30°C. Para obtener solo las células bacterianas se realizó un lavado por centrifugación (Heraeus Biofuge PrimoR) a 8500 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Posteriormente se decantó el sobrenadante y se añadieron 8 ml de agua destilada en cada tubo, se procedió a una segunda centrifugación y decantación, se repitieron los pasos hasta ajustar tres lavados. Después se ajustó la dosis infectiva, para esto, después del tercer lavado se añadieron 2 ml de agua destilada a cada tubo, se mezcló en un vortex (VWR Vortex mixer, Scientific Industries S.A.) y se vertieron en una celda para espectrofotómetro (Hach.DR/2010) con 2 ml de agua destilada para medir la absorbancia a una longitud de onda de 610 nm. Se ajustó la absorbancia a  $1.000 \pm 0.002$  equivalente a una densidad de  $1 \times 10^8$  UFC/ml. Para estimar la densidad real del inóculo empleado en los desafíos se procedió a realizar cinco diluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  UFC/ml, estas dos últimas se sembraron por triplicado en placas de TSA y se incubaron a 30°C por 24 h. Los inóculos se prepararon para llevar a cabo los desafíos con células bacterianas por vía intraperitoneal y por vía inmersión.

#### **5.4.1 Desafío vía intraperitoneal**

##### **5.4.1.1 Células bacterianas**

Se seleccionaron tilapias visiblemente sanas con un peso promedio entre 3 y 5 g y se distribuyeron aleatoriamente en peceras de vidrio con capacidad de 1 L de agua dulce, la cual fue filtrada y aireada 24 h antes de montar los bioensayos. Los peces se aclimataron en los acuarios durante dos días y se alimentaron con una dieta comercial (Nutripec) con contenido proteico del 32% dos veces al día *ad libitum*. En cada pecera se colocaron ocho peces con un peso promedio en cada pecera de 3.2 g.

Los peces se desinfectaron con alcohol al 70% y luego se inyectaron intraperitonealmente con 40  $\mu$ l de la suspensión bacteriana. Se probaron dos dosis una dosis de  $1.86 \times 10^5$  y una de  $1.55 \times 10^6$  cel/g realizándose todo por triplicado, además se estableció un grupo control al cual se le inyectó 40  $\mu$ l de una solución de PBS (Buffer fosfato salino) con pH de 7.2.

Se hicieron observaciones diarias por cinco días, registrando los signos clínicos y la mortalidad a intervalos regulares de tiempo.

### **Aislamiento de cepas a partir de órganos de tilapias infectadas**

Se consideró la mortalidad consecuencia de las células bacterianas de *Aeromonas dhakensis* solo cuando se aisló el agente bacteriano en cultivo puro a partir de los órganos internos del pez (riñón, hígado, bazo y cerebro). Los peces moribundos fueron diseccionados bajo condiciones de esterilidad, primero se lavaron con agua estéril y luego se diseccionaron con tijeras estériles en la zona abdominal empezando por el ano para dejar expuestos todos los órganos (riñón, hígado y bazo). En el caso del cerebro se hizo un corte horizontal en la parte superior de la cabeza utilizando una navaja estéril. Se tomó una muestra de cada órgano se sembró en agar TSA, Mac Conkey y agar sangre, luego las placas se incubaron por 24 h a 30°C.

Posteriormente se purificaron las colonias aisladas sembrándolas en TSA, hasta obtener un cultivo puro, preservándolas temporalmente en tubos de 1.5 ml con agar TSA y glicerol. Para comprobar la presencia e identidad de la cepa utilizada para infectar a las tilapias se llevó a cabo una caracterización por rep-PCR, usando como control la cepa inyectada CAIM 1873 *A. dhakensis* de acuerdo a la metodología descrita por Gómez-Gil *et al.* (2004).

### **Tinción Gram**

La tinción Gram se realizó utilizando el kit de tinción Gram Hycel de México. Este método consiste en hacer un frotis sobre un portaobjetos limpio de los aislados que se obtuvieron a partir de la siembra en TSA de los órganos extraídos de los peces infectados con células bacterianas, se fijó calentando

sobre la flama del mechero, se agregó cristal violeta y se dejó por un minuto, después se enjuagaron con agua corriente y se escurrió el exceso de agua, enseguida se agregaron unas gotas de lugol y se mantuvo por un minuto, se decoloraron utilizando etanol al 70% y se enjuagaron con agua corriente escurriendo el exceso de agua de las laminillas, posteriormente se agregaron unas gotas de safranina y se dejó actuar por 30 segundos, se enjuagaron con agua corrientes y se dejaron secar. Por último la visualización de las laminillas se llevó a cabo utilizando un microscopio de luz Carl Zeiss, Axiolab drd KT a un aumento de 100X.

### **Motilidad**

Se empleó el método de gota colgante, lavando los portaobjetos y colocando unas gotas de parafina derretida, inmediatamente después se colocó una gota de agua estéril inoculada con el aislado bacteriano en un cubreobjetos. Para su observación se utilizó un microscopio de luz (Carl Zeiss, Axiolab) a 100X.

### **Caracterización por rep-PCR**

- Extracción de ADN

Se sembraron colonias puras preservadas en agar TSA las cuales procedieron de los muestreos realizados entre las 5-13 h postinfección de aislados de hígado, bazo y riñón de peces infectados y se incubaron a 30°C por 24 h, estas colonias. También se sembró la cepa utilizada para infectar a los peces (CAIM 1873) ya que esta se tomó como control positivo

Se tomó una muestra del crecimiento bacteriano obtenido a partir de cada colonia preservada y se suspendió en 600 µl de solución lisis (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega) en tubos Eppendorf para lisar las células, se mezcló vigorosamente durante 20 segundos y se incubó en un termoblock (VWR Scientific industries Inc. USA) a 95°C durante 5 minutos e inmediatamente después se enfrió en hielo. Después se agregaron 3 µl de RNAsa al lisado celular, se mezcló invirtiendo los tubos entre 2 y 3 veces y

se incubo a 37°C por 1 h. Después se agregaron 200 µl de solución precipitadora de proteínas, se agitó vigorosamente por 20 segundos y se incubó 5 minutos en hielo.

Posteriormente se centrifugó a 13,000 g por 3 minutos y se transfirió el sobrenadante que contenía el ADN a tubos Eppendorf con 600 µl de isopropanol, se invirtieron los tubos varias veces hasta lograr observar la hebra de ADN. Se centrifugó nuevamente a 13,000 g por 2 minutos y se retiró el sobrenadante, quedando precipitado el ADN el cual fue lavado con 600 µl de etanol al 70%.

Por último se centrifugó a 13,000 g por 2 minutos, se retiró el sobrenadante (etanol al 70%) y se invirtieron los tubos para secarlos al aire libre por 15 minutos. Para rehidratar las muestras se agregaron 20 µl de agua 18 MΩ estéril y se almacenaron a 4°C.

#### - Rep-PCR

En un tubo Eppendorf de 0.2 mL se agregaron las siguientes reactivos: 18 µl de buffer H/C (KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM; Tris HCl pH 8.8 10 mM; Triton X-100 al 1%), 1 µl de dNTP's (25 mM), 2 µL de iniciador (GTG)<sub>5</sub> 2 µL de Taq polimerasa (Promega, 5 U/µl). Posteriormente se agregó 2 µl de ADN (ajustado a 50 ng/µl), el volumen final de cada reacción fue de 25 µl.

El protocolo de rep-PCR en el termociclador (MyCycler™ Thermalcycler, BIORAD) fue de 7 minutos a 94°C para la desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 90°C, 35 ciclos de 30 segundos a 45°C, 35 ciclos de 90 segundos a 70°C y 3 minutos a 70°C para lograr la extensión final.

#### - Electroforesis

Las muestras obtenidas de la reacción de rep-PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1.2% (Grado analítico, Promega, USA) en buffer TAE 1X con pH 8, cada reacción de PCR se mezcló con 5 µL de buffer de carga. Se

agregaron 15  $\mu$ l de cada muestra preparada en cada carril del gel, además del marcador de peso molecular Kapa Express DNA Ladder Kit. El gel se corrió en frío en una cámara de electroforesis horizontal (E-C maxicell EC360M, USA) durante 1 h 30 minutos con una fuente de poder (EPS 301, Amersham pharmacia biotech, USA) a 90 V. Posteriormente el gel se observó en un fotodocumentador (ChemiDoc XRS+ System with Image Lab Software, BIORAD) y se fotografió, guardando la imagen en archivo TIFF.

#### **5.4.1.2 Desafío con los productos extracelulares**

El diseño y procedimiento para este desafío fue el mismo que se aplicó anteriormente durante la infección con células bacterianas de *A. dhakensis*. Se seleccionaron tilapias sanas con un peso entre 3 y 5 g y se colocaron en peceras de vidrio con 1 litro de agua dulce potable, la cual fue filtrada y aireada por 24 h antes de correr el bioensayo. Los peces se aclimataron en las peceras durante 48 h y se alimentaron con la dieta comercial Nutripec con un nivel de proteína del 32% dos veces al día *ad libitum*. En cada pecera se colocaron 8 peces y el peso promedio obtenido en cada una de las peceras fue de 3.2 g. El promedio se calculó en base al peso de cada uno de los organismos.

Los peces se inyectaron intraperitonealmente con una dosis de 0.178, 0.356 y 0.462  $\mu$ g de proteína contenida en los productos extracelulares de *A. dhakensis*. Cada dosis se consideró como un tratamiento por triplicado, además se estableció un grupo control con PBS, al cual se le inyectó 130  $\mu$ l de PBS. Se hicieron observaciones por cinco días, registrando los signos clínicos y la mortalidad a intervalos regulares de tiempo.

Tanto en el desafío de infección con células bacterianas como en el realizado con productos extracelulares se tomaron muestras de los órganos internos (hígado, riñón, bazo y cerebro) de peces para preservarlos en formalina neutralizada al 10X y llevar a cabo el proceso histológico

#### **5.4.1.3 Proceso histológico**

El proceso consistió en tomar muestra de los peces a las 2,4,6,10 y 24 h.p.i cuando se infectaron con PECs y a las 3, 6, 9, 12 y 24 h.p.i cuando se infectaron con células bacterianas, se diseccionaron de la parte abdominal iniciando por el ano hasta dejar los órganos expuestos. Después de localizar el hígado, riñón, y bazo estos se tomaron cuidadosamente con pinzas y se colocaron en envases que contenían 45 ml de formalina neutralizada al 10%. En el caso del cerebro fue necesario utilizar una navaja para realizar un corte horizontal sobre la parte superior de la cabeza y así poder extraerlo y preservarlo en formalina neutralizada al 10%.

Los órganos de cada pez se mantuvieron en el mismo envase, cada uno identificado con una etiqueta que contenía las características de cada muestra.

Posteriormente las muestras fijadas se colocaron en Uni-cassette Tissue-Tek. Para iniciar el proceso de deshidratación y aclaramiento se colocaron las muestras en una canastilla de acero inoxidable y utilizando el procesador de tejidos Sakura modelo 4640-B con alcohol en diferentes concentraciones (70, 80, 96 y 100%) seguida por un tratamiento en Xilol, este proceso duró 19 h. Después se pasaron al embebedor de tejidos Leica modelo Histoembedder, donde las muestras fueron colocadas en moldes de acero inoxidable y embebidas en parafina, se dejaron enfriar para sacarlos del molde y así obtener el bloque de parafina con la muestra que sería cortada. Los cortes se hicieron a 5 micras con un microtomo Leica modelo 820. Los tejidos con secciones de hueso se descalcificaron antes de realizar el corte final. Una vez que se realizaron los cortes se colocaron en un portaobjetos, donde se extendieron con unas gotas de alcohol al 50% y calor proporcionado por una plancha caliente marca Lab-Line. Una vez secos los tejidos del portaobjetos se marcaron con un lápiz punta de diamante y se colocaron en una canastilla de plástico para después teñirlos. La tinción de los tejidos se realizó con el método de tinción Hematoxilina – Eosina –

Floxina. Posteriormente, a cada lámina se les agregó resina para colocar el cubreobjetos y así obtener un preparado histológico permanente. Para la identificación de las muestras se etiquetaron utilizando un marcador indeleble de punta fina. Las láminas fueron observadas utilizando un microscopio marca Olympus modelo CH30 y se reportaron las alteraciones patológicas en cada lámina.

#### **5.4.2 Desafíos vía inmersión con células bacterianas y productos extracelulares**

Se realizaron infecciones preliminares vía inmersión con células bacterianas y productos extracelulares colocando ocho híbridos de tilapia por tratamiento en peceras con capacidad de 1 L. Se aclimataron por dos días y se alimentaron *ad libitum* con la dieta comercial Nutripec con contenido proteico del 32%.

Posteriormente se infectaron vía inmersión con células bacterianas a una densidad de  $2.47 \times 10^7$  cel/ml considerándose esta como un tratamiento por triplicado además se estableció como control (por triplicado) un grupo al cual se le añadieron 10 ml de PBS estéril.

En el caso de la infección vía inmersión con productos extracelulares se agregaron 3.554 mg de proteína y 14.216 mg de proteína considerándose cada uno como un tratamiento por triplicado y un grupo control al cual se le agregaron 10 ml de PBS. En ambos casos no hubo recambio de agua.

## VI. RESULTADOS

### 6.1 Caracterización fenotípica

#### 6.1.1 Crecimiento de *Aeromonas dhakensis*

Se encontró que la cepa de *A. dhakensis* crece a las 24 h en un rango de salinidad que va desde 0.0 a 5.0 g/l NaCl, seguida por un crecimiento más lento presentado a las 48 h en una salinidad de 5.5 g/l. Es importante notar que en la salinidad que va de 6 a 10 g/L no hubo crecimiento alguno por parte de la cepa (Tabla 1).

La cepa *A. dhakensis* presenta crecimiento abundante a un rango de temperatura entre 20 y 37°C ya que su desarrollo inició a las 24 h, sin embargo es importante mencionar que también presentó crecimiento a temperaturas bajas (4°C) como se puede observar en la Tabla 1 aunque de una manera más lenta, después de las 72 h.

*A. dhakensis* crece de forma abundante a las 24 h tanto en concentraciones acidas (pH 5-6), neutras (pH 7) y en ambientes básicos, desde un pH de 8 hasta 10.

Tabla 1 Crecimiento de *Aeromonas dhakensis* CAIM 1873 a diferente salinidad, temperatura y pH.

Parámetro		Tiempo (h)							
		0	24	48	72	96	120	144	168
Salinidad (g/L)	0.0	-	+++						
	0.5	-	+++						
	1.0	-	+++						
	1.5	-	+++						
	2.0	-	+++						
	2.5	-	+++						
	3.0	-	+++						
	3.5	-	+++						
	4.0	-	+++						
	4.5	-	+++						
	5.0	-	+++						
	5.5	-	-	++					
	6.0	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.5	-	-	-	-	-	-	-	-
	7.0	-	-	-	-	-	-	-	-
	7.5	-	-	-	-	-	-	-	-
	8.0	-	-	-	-	-	-	-	-
8.5	-	-	-	-	-	-	-	-	
9.0	-	-	-	-	-	-	-	-	
9.5	-	-	-	-	-	-	-	-	
10.0	-	-	-	-	-	-	-	-	
Temperatura (°C)	4	-	-	-	+	++			
	20	-	+++						
	30	-	+++						
	37	-	+++						
	40	-	-	-	-	-	-	-	
pH	4	-	-	-	-	-	-	-	
	5	-	+++						
	6	-	+++						
	7	-	+++						
	8	-	+++						
	9	-	+++						
	10	-	+++						

+: Leve, ++: Moderado y +++: Abundante

## 6.1.2 Pruebas de sensibilidad a antibióticos

### 6.1.2.1 Antibiograma

*Aeromonas dhakensis* se sometió a pruebas de susceptibilidad a diferentes antibióticos, de acuerdo García *et al.* (1994) en los resultados obtenidos en la medición de los halos, la cepa fue sensible a norfloxacin (30 µg), gentamicina (10 µg), oxitetraciclina (10 µg), florfenicol (5 µg) y enrofloxacin (2 µg) como se muestra en la Tabla 2. En cambio a los antibióticos que

presentó resistencia fueron sulfametoxazol (10µg) y eritromicina (5 µg) (Figura 1).

Tabla 2 Diámetro del halo de inhibición a antibióticos de *A. dhakensis*.

Antibiótico	Concentración(µg)	Medida del halo (mm)	Sensibilidad
Norfloxacina	30	49.5	S
Enrofloxacina	10	27	S
Gentamicina	10	14.5	S
Florfenicol	5	14	S
Oxitetraciclina	10	11	S
Sulfametoxazol	2000	6	R
Eritromicina	50	6	R

S: Sensible, I: Intermedio, R: Resistente. Fuente: García *et al.* (1994).

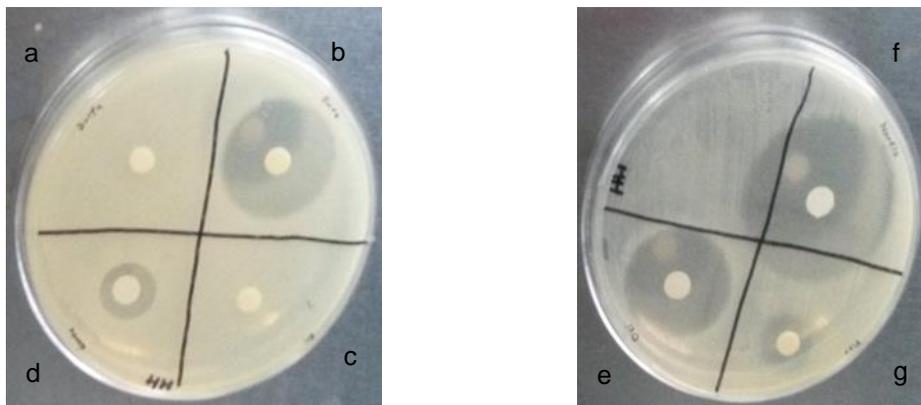


Figura 1. Antibiograma de *A. dhakensis* en agar Mueller Hinton como medio de crecimiento. a) Sulfametoxazol, b) Enrofloxacin, c) Eritromicina, d) Gentamicina, e) Oxitetraciclina, f) Norfloxacin y g) Florfenicol

### 6.1.2.2 Concentración mínima inhibitoria (MIC)

En la Tabla 3 se puede observar que la MIC para la cepa *A. dhakensis* fue de 0.3 µg/ml tanto de gentamicina como de oxitetraciclina, por otro lado

presenta mayor resistencia al sulfametoxazol pues requiere de una MIC de 1950 µg/ml y a la eritromicina con una MIC de 20 µg/ml.

Tabla 3 Determinación de la MIC utilizando diversos antibióticos que permitan inhibir el crecimiento de *A. dhakensis*

Concentración (µg/ml)	SX	ERI	NOR	ENRO	FLO	GEN	OXI
0	+	+	+	+	+	+	+
0.1	+	+	+	+	+	+	+
0.3	+	+	+	+	+	-	-
1	+	+	+	+	+	-	-
1.2	+	+	+	+	-	-	-
1.6	+	+	+	-	-	-	-
3	+	+	+	-	-	-	-
4	+	+	-	-	-	-	-
10	+	+	-	-	-	-	-
20	+	+	-	-	-	-	-
30	+	-	-	-	-	-	-
60	+	-	-	-	-	-	-
100	+	-	-	-	-	-	-
500	+	-	-	-	-	-	-
1000	+	-	-	-	-	-	-
1500	+	-	-	-	-	-	-
1900	+	-	-	-	-	-	-
1950	-	-	-	-	-	-	-
2000	-	-	-	-	-	-	-

SX: Sulfametoxazol, ERI: Eritromicina, NOR: Norfloxacin, ENRO: Enrofloxacin, FLO: Florfenicol, GEN: Gentamicina y OXI: Oxitetraciclina. Fuente: García *et al.* (1994).

## 6.2 Factores de virulencia

### 6.2.1 Concentración de proteínas y actividad proteolítica de los productos extracelulares de *A. dhakensis*

El método colorimétrico de Bradford utilizado para cuantificar la concentración de proteína presente en los PECs dio como resultado un contenido de 3.55 µg/ml. La actividad proteolítica de los PECs extraídos de

*A. dhakensis* presentaron un valor de 0.32 U/ml, por debajo de 1 U/ml, que es el valor que indica una unidad de actividad proteolítica.

### **6.2.2 Detección de sideróforos en los productos extracelulares de *A. dhakensis***

La producción de sideróforos de los productos extracelulares de *Aeromonas dhakensis* fue de  $0.26 \pm 0.02$   $\mu\text{M}$  de sideróforos por  $10^8$  UFC/ml de bacteria (turbidez del 0.5 en escala de MacFarland).

### **6.2.3 Actividad hemolítica de los productos extracelulares de *A. dhakensis*.**

La actividad hemolítica resultó negativa a las 48 h para los productos extracelulares empleando el método de rastrillo e inoculación en orificios de 2x1 cm en las placas de agar sangre.

### **6.2.4 Actividad citotóxica en los productos extracelulares de *A. dhakensis***

Se realizaron curvas dosis-respuesta del efecto de la fracción del extracto de PECs de *Aeromonas dhakensis* sobre el crecimiento de la línea celular normal 3T3L1. Se observó que existe un efecto sobre la sobrevivencia celular en función de la concentración del extracto obtenido a partir de los PECs de *A. dhakensis* (Figura 2), ya que las concentraciones de 5.0 y 10.0 mg/ml causaron muerte celular del 54 y 55% respecto al control (Dunnett,  $n=3$ ,  $p \leq 0.05$ ). En cambio la concentración de 1 mg/ml resultó citostática y no presentó diferencias significativas respecto al control en ninguno de los dos estadísticos utilizados (Tukey,  $n=3$ ,  $p \leq 0.5$ , Dunnett,  $n=3$ ,  $p \leq 0.05$ ).

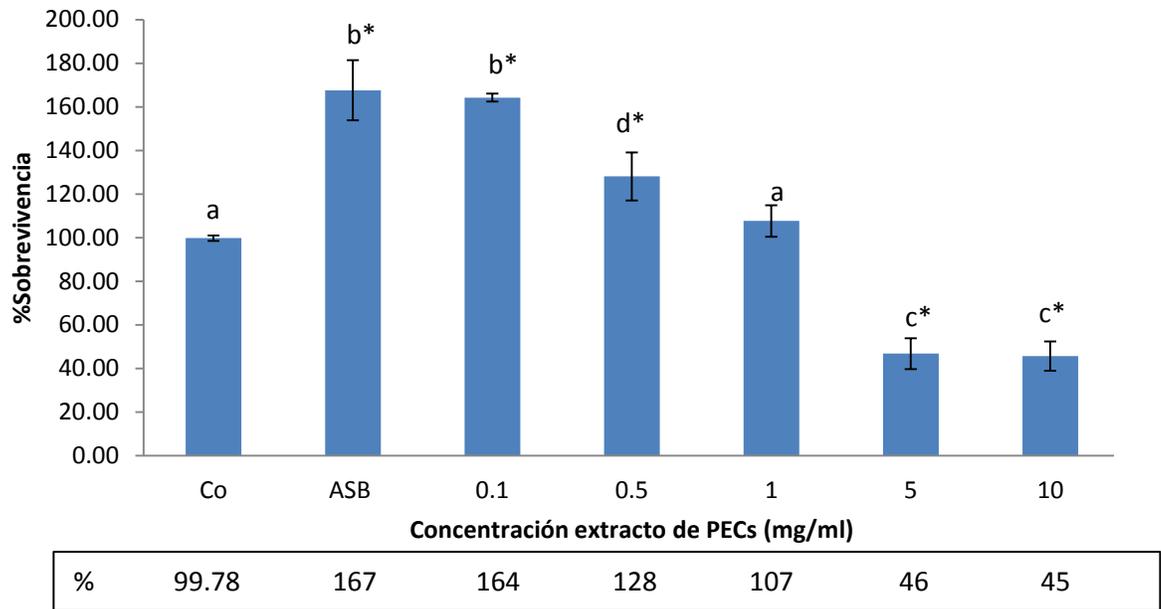


Figura 2 Efecto del extracto de productos extracelulares de *A. dhakensis* sobre la sobrevivencia de células 3T3L1 a 24 h de tratamiento. Las letras minúsculas representan diferencia significativa entre los tratamientos (Tukey,  $n=3$ ,  $p\leq 0.05$ ). El asterisco representa una diferencia significativa entre cada tratamiento y el control (Dunnett,  $n=3$ ,  $p\leq 0.05$ ). Co: control inicial con SFB. ASB: control final con ASB.

Las concentraciones más bajas probadas (0.1 y 0.5 mg/ml) resultaron tener un efecto estimulador sobre las células, lo cual indica que no causan ningún efecto citotóxico sobre las células. Todas las concentraciones fueron preparadas utilizando la albumina sérica de bovino, proteína que posee factores que ayudan al crecimiento celular por lo que está relacionado con la estimulación sobre las células en las concentraciones de 0.1 y 0.5 mg/ml.

En cuanto a la proliferación celular esta disminuyó significativamente respecto al control en todos los tratamientos utilizados (0.1, 0.5, 1.0, 5.0 y 10.0 mg/ml) (Dunnett,  $n=3$ ,  $p\leq 0.05$ ) en un 14, 26, 40, 73, y 74% respectivamente (Figura 3). Además todas las concentraciones presentaron diferencias significativas (Tukey,  $p<0.05$ ) menos las concentraciones más altas (5 y 10 mg/ml).

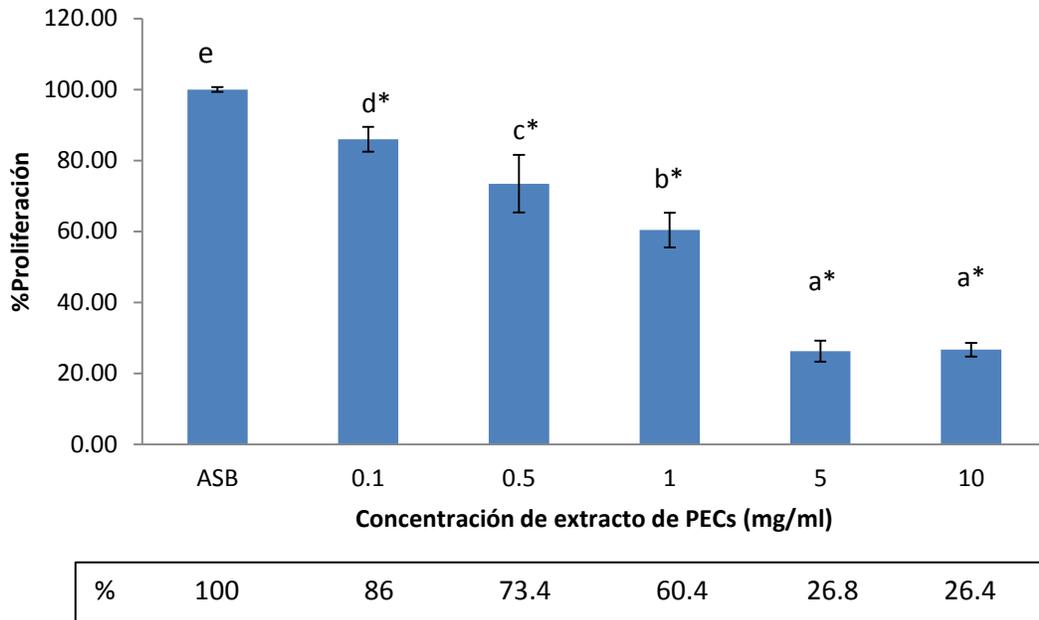


Figura 3 Efecto del extracto de productos extracelulares de *A. dhakensis* sobre la proliferación de células 3T3L1 a 24 h de tratamiento. Las letras minúsculas representan diferencia significativa entre los tratamientos (Tukey,  $n=3$ ,  $p\leq 0.05$ ). El asterisco representa una diferencia significativa entre cada tratamiento y el control (Dunnett,  $n=3$ ,  $p\leq 0.05$ ).

La concentración letal media ( $CL_{50}$ ) y la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) se calcularon mediante regresión lineal simple. Para obtener la  $CL_{50}$  la regresión se llevó a cabo entre el índice de sobrevivencia de las células y el Logaritmo (Log) de las concentraciones utilizadas (Figura 4), en cambio para la  $CI_{50}$  la regresión lineal fue entre el índice de proliferación celular y el logaritmo de las concentraciones (Figura 5). Se muestra el promedio de al menos tres tratamientos independientes.

La  $CI_{50}$  a las 24 h de tratamiento fue de  $1.19 \mu\text{g/ml}$  mientras que la  $CL_{50}$  fue de  $2.21 \mu\text{g/ml}$  lo cual indica que para lograr el 50% de muerte celular se requiere el doble de la concentración inhibitoria.

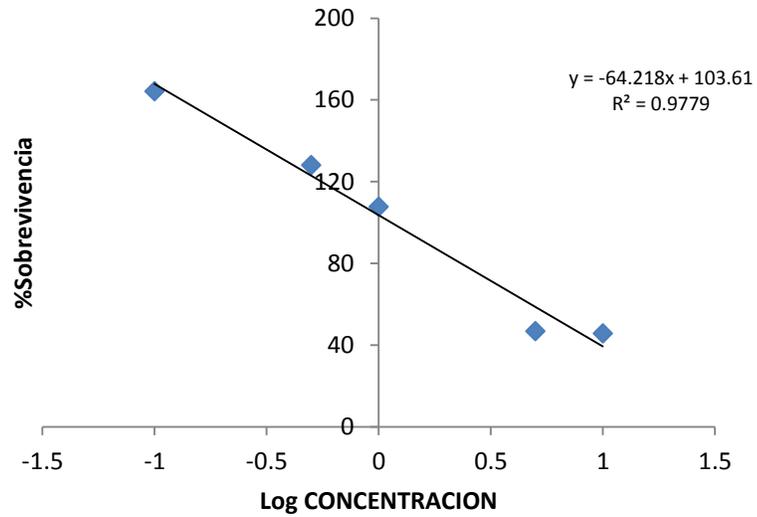


Figura 4 La concentración letal media ( $CL_{50}$ ) calculada por regresión lineal simple entre el índice de sobrevivencia celular y el logaritmo de la concentración del extracto de PECs de *A. dhakensis*.

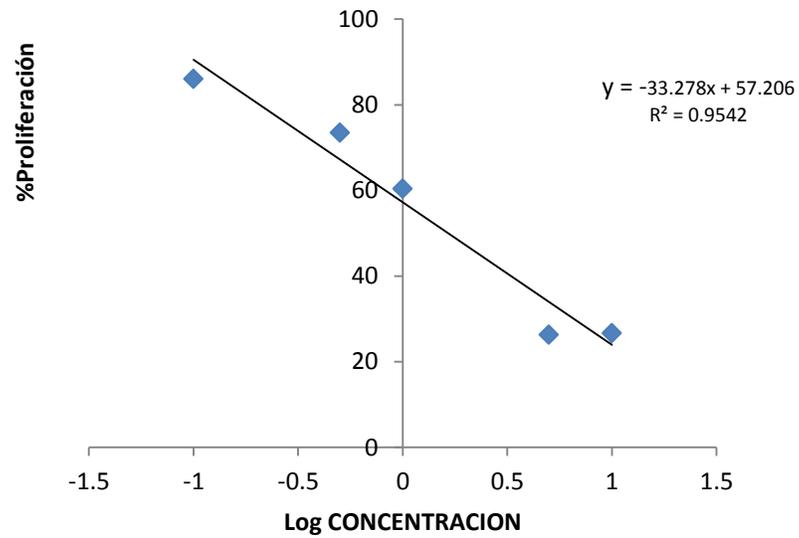


Figura 5 La concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) se calculó por regresión lineal entre el índice de proliferación celular y el logaritmo de la concentración del extracto de PECs de *A. dhakensis*.

En resumen, *Aeromonas dhakensis* cepa CAIM 1873 son bacilos Gram negativos móviles, toleran concentraciones de sal del 5.5%, temperaturas de 4 a 37°C y pH de 4 a 10. Además las células bacterianas presentan actividad hemolítica ( $\beta$ -hemólisis) y susceptibilidad al antibiótico de gentamicina (MIC de 0.3  $\mu\text{g/ml}$ ). Los PECs de *A. dhakensis* poseen actividad citotóxica sobre la línea celular 3T3L1 y requieren de una  $\text{CL}_{50}$  de 2.21  $\mu\text{g}$  de proteína/ml así como una  $\text{Cl}_{50}$  de 1.19  $\mu\text{g}$  de proteína/ml (Tabla 4).

.Tabla 4 Caracterización de las células bacterianas y productos extracelulares de *A. dhakensis* CAIM 1873.

	<b>Característica</b>	<b><i>A. dhakensis</i> CAIM 1873</b>
<b>Célula bacteriana</b>	Tinción Gram	-
	Morfología de la célula	Bacilos
	Motilidad	+
	Actividad hemolítica 24 h	+
	<i>Tolerancia a salinidad</i>	
	0%	-
	1%	+
	2%	+
	3%	+
	4%	+
	5%	+
	5.5%	+
	6%	-
	8%	-
	10%	-
	<i>Tolerancia a temperatura</i>	
	4 ° C	+
	20 ° C	+
	30 ° C	+
	37 ° C	+
	40 ° C	-
<i>Tolerancia a pH</i>		
1	-	
2	-	
4	+	
6	+	
8	+	
10	+	
<i>Concentración mínima inhibitoria (MIC)</i>		
	Gentamicina	0.3 µg/ml
<b>Productos extracelulares (PECs)</b>	Proteína total	3.32(µg/ml)
	Actividad proteolítica	0.52 (U/ml)
	Producción de sideróforos	0.26 µM
	Actividad hemolítica 24 y 48 h	-
	Actividad citotóxica (3T3L1) 24 h	+
	CL <sub>50</sub>	2.21 µg de proteína/ml
	CI <sub>50</sub>	1.19 µg de proteína/ml

### 6.3 Desafíos experimentales

#### 6.3.1. Infección vía intraperitoneal con células bacterianas de *Aeromonas*

##### *dhakensis* CAIM 1873 en híbridos de tilapia

Se alcanzó una mortalidad del 79.2% de los organismos infectados con una dosis de células de  $1.55 \times 10^6$  cel/g a las 13 h pos infección (h.p.i), alcanzando el 95% de mortalidad a las 94 h.p.i. El 50% de mortalidad a una dosis de  $1.55 \times 10^6$  cel/g fue a las 12:30 h.p.i, mientras que a una dosis de  $1.86 \times 10^5$  cel/g fue a las 109 h.p.i (Figura 6).

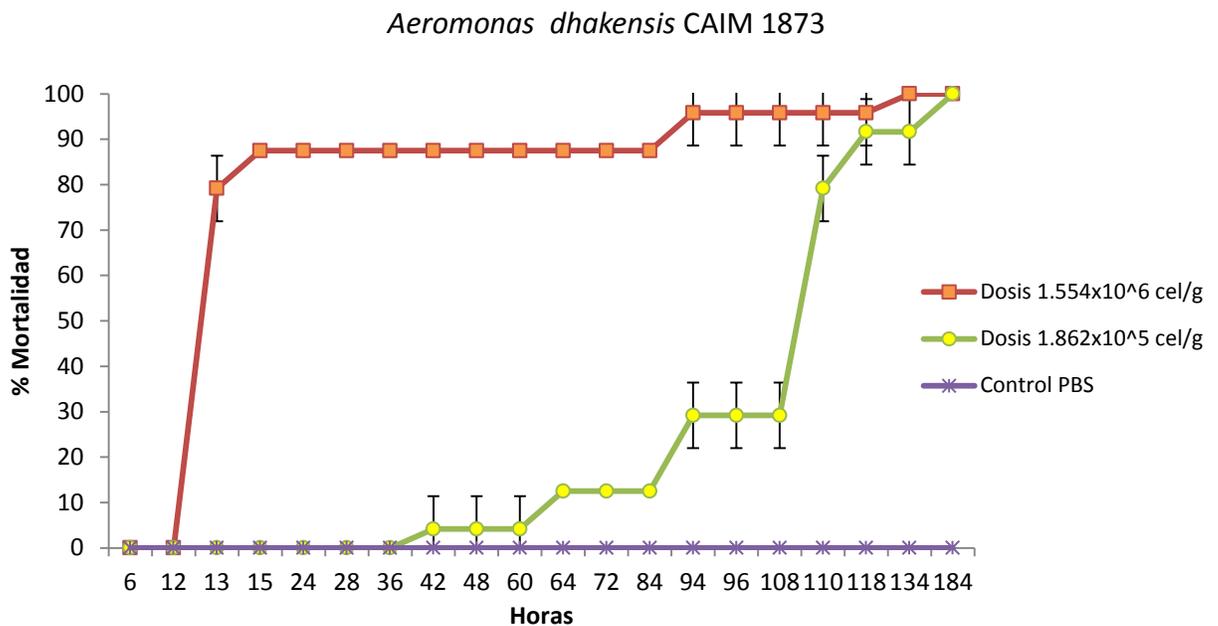


Figura 6 Mortalidad acumulada de organismos infectados con células bacterianas de *A. dhakensis*. n=3.

A las 94 h.p.i, la dosis de  $1.55 \times 10^6$  cel/g causó más del 95% de mortalidad, mientras que a la dosis más baja ( $1.86 \times 10^5$  cel/g), solo el 29%. No se presentaron mortalidades en organismos inyectados con PBS, los cuales se tomaron como control.

Los signos clínicos de los organismos infectados con las células bacterianas fueron similares para ambas dosis solo que se presentaron de manera más tardía con la dosis más baja de  $1.86 \times 10^5$  cel/g. En el caso de los peces infectados con la dosis de  $1.55 \times 10^6$  cel/g, a las 5 h.p.i, se observaron zonas hemorrágicas desde las aletas pectorales hasta el opérculo, de las 7 a las 13 h.p.i presentaban aumento se zonas con hemorragias, letargia y anorexia, a las 18 h.p.i se detectó nado errático y dificultad para respirar. En cambio los infectados con la dosis de  $1.86 \times 10^5$  a las 13 h.p.i se detectó comportamiento agresivo, a las 64 h.p.i aparecieron zonas hemorrágicas desde la aleta pectoral hasta el opérculo, 96 h.p.i presentaron anorexia y aumento de las zonas hemorrágicas desde la aleta pectoral hasta la anal (Figura 7).

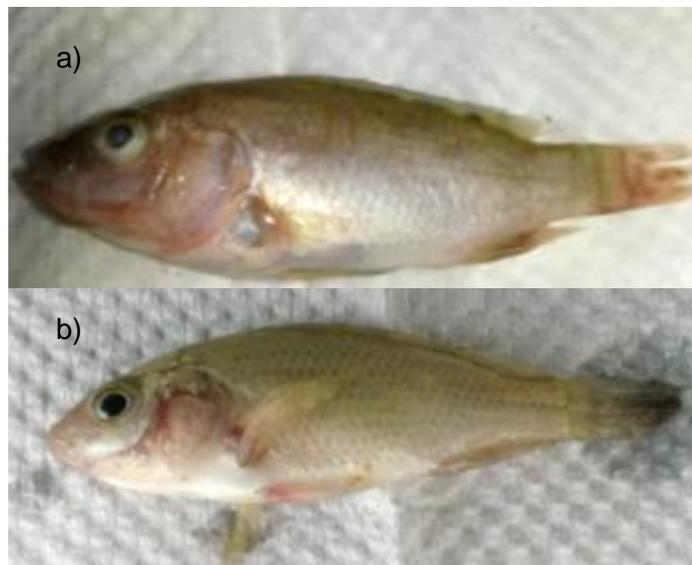


Figura 7. Tilapias infectadas vía intraperitoneal con células bacterianas de *A. dhakensis*. a) Zona hemorrágica en la región de la aleta pectoral y opérculo, inflamación en abdomen y erosión en aleta caudal. b) Zona hemorrágica en las aletas pélvica, pectoral y en el opérculo.

### **6.3.2. Infección vía intraperitoneal con productos extracelulares de *Aeromonas dhakensis* en híbridos de tilapias**

En los organismos infectados con una dosis de 0.462  $\mu\text{g}$  de proteína a las 24 h.p.i ya se tenía el 100% de mortalidad. En cambio en los organismos infectados con dosis menores (0.178 y 0.356  $\mu\text{g}$  de proteína) se alcanzó solo el 20% de mortalidad al final del ensayo (120 h.p.i Figura 8).

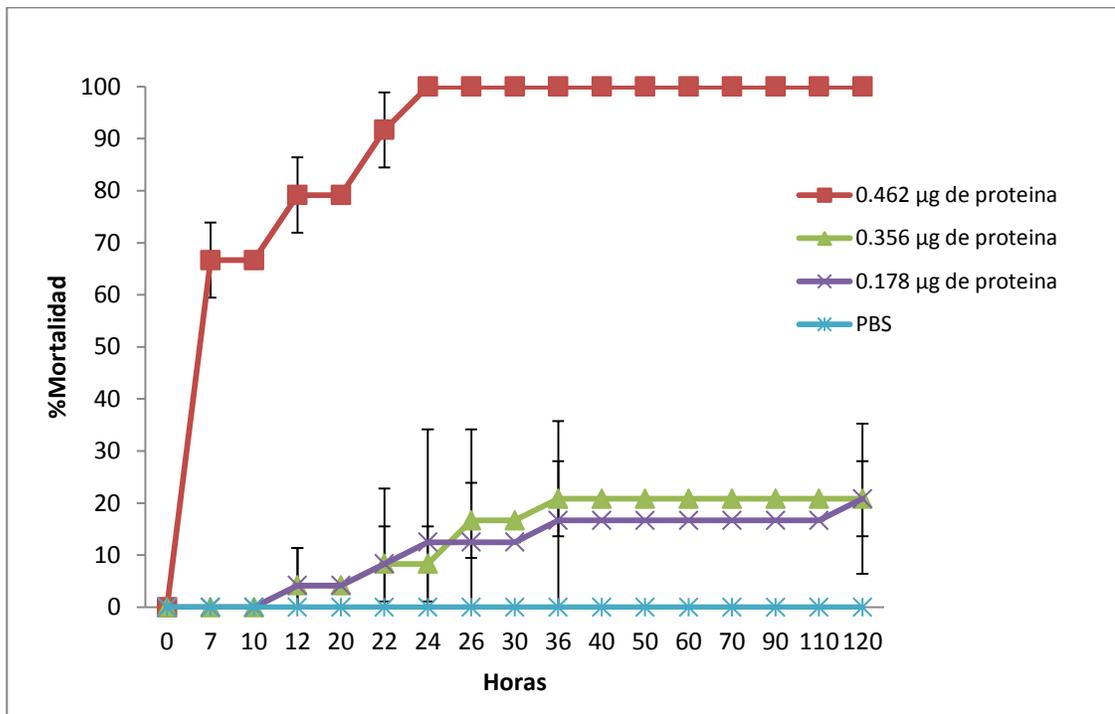


Figura 8 Mortalidad acumulada de organismos infectados con productos extracelulares de *A. dhakensis*. n=3. Las barras indican la desviación estándar respecto al promedio de la mortalidad.

Los signos clínicos que se observaron en los organismos infectados con la dosis de 0.462  $\mu\text{g}$  de proteína de PECs de *A. dhakensis* fueron similares a los observados durante la infección con células bacterianas, lo diferente fue que en la infección realizada con los PECs los signos se presentaron de manera más temprana. A las 4 h.p.i se observaron daños en las aletas pectorales (tronco), a las 6 h.p.i se observan algunos con dificultades para respirar, nado errático y algunos moribundos, para las 7 h.p.i la mayoría presentan daños (lesiones hemorrágicas) en las aletas pectorales,

inflamación del estómago y enrojecimiento en la zona de branquias (Figura 9).

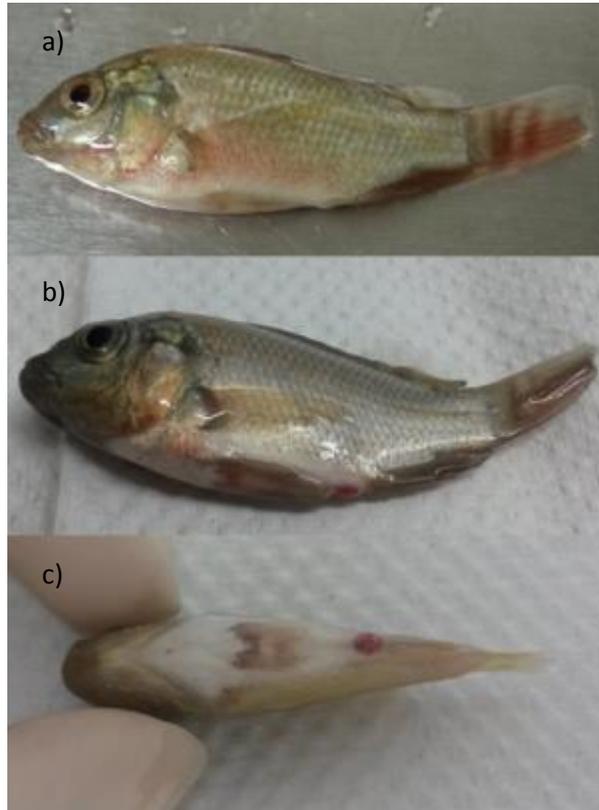


Figura 9. Tilapias desafiadas con los PECs de *A. dhakensis*. a) Zona hemorrágica desde el opérculo hasta aleta anal. b) Hemorragia en opérculo, aleta pectoral y aleta pélvica. c) Hemorragia e inflamación del ano.

En el caso de los peces infectados con las dosis más bajas (0.178 y 0.356  $\mu$ g de proteína) no se observaron daños aparentes en los muertos ni en los sobrevivientes.

### **6.3.3. Ensayos preliminares vía inmersión con células bacterianas y productos extracelulares de *A. dhakensis***

Es importante mencionar que se realizaron infecciones preliminares vía inmersión tanto con células bacterianas como con los PECs de *A. dhakensis*, se observó en el primer caso que los grupos infectados a una densidad bacteriana de  $2.47 \times 10^7$  cel/ml presentaron mortalidad del 70% a las 88 h.p.i., sin embargo la mortalidad también se presentó en los grupos control (30%). Por otro lado en el segundo caso las infecciones con 3.554 y 14.215 mg de proteína de los PECs las mortalidades comenzaron 72 y 90 h.p.i con 35 y 43% de mortalidad respectivamente, además se presentaron mortalidades del 42% en los grupos control. Posiblemente, la adición del PBS produce una proliferación de bacterias en el agua causando su descomposición. De acuerdo a los resultados obtenidos, se sugiere que mediante la vía de infección con *A. dhakensis* por inmersión no es posible reproducir la enfermedad en híbridos de tilapia, ya que no permite observar los signos clínicos ni mortalidad.

### **6.3.4 Análisis histopatológico de los órganos preservados**

Las muestras de tejido revisadas por medio de diagnóstico histológico durante los experimentos de infección con células y con los PECs de *A. dhakensis* fueron bazo, hígado, riñón y cerebro.

El bazo es un órgano encapsulado por medio de una capa de tejido conectivo fibroso fino, cubierto por una sola capa de células mesoteliales. La vena esplénica y la arteria entran a través del tejido donde la arteria se divide en varias ramas, y corren a lo largo del bazo. Ramas capilares de la arteria esplénica, denominados elipsoides, se encuentran dispersos dentro de un estroma reticular y hay numerosos centros de melano-macrófagos. Las arteriolas de la arteria esplénica dan lugar a los capilares de paredes

gruesas, que se alinean por el endotelio, rodeadas de una vaina de células reticulares para formar elipsoides (Morrison *et al.*, 2006). Antígenos como virus y bacterias quedan atrapadas en los elipsoides y luego son trasladados a centros de melano-macrófagos por los macrófagos

La organización del bazo de la tilapia es similar al del tejido hematopoyético en la cabeza del riñón (Figura 10) Sailendri y Muthukaruppan (1975), no encontraron centros linfoides bien definidos, aunque hay concentraciones de linfocitos, como eritrocitos y granulocitos en diferentes etapas de formación. Los elipsoides tienen capilares centrales y están estrechamente relacionados con los vasos sanguíneos de paredes delgadas.

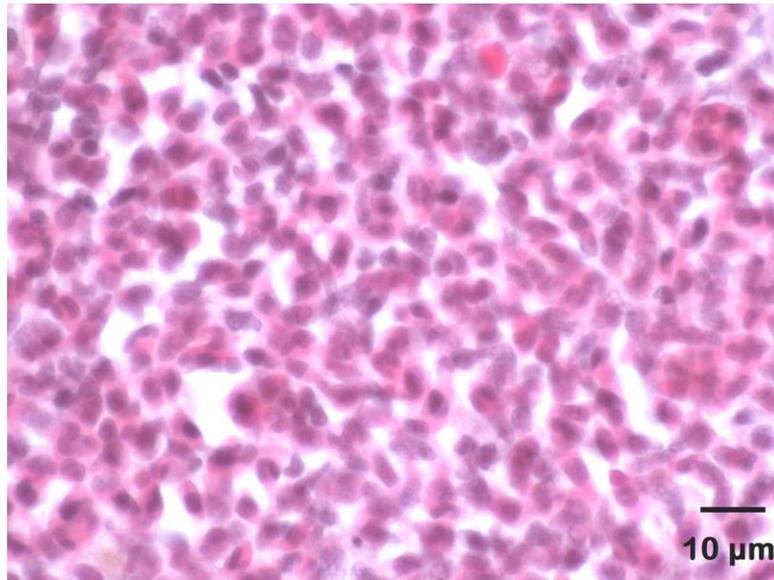


Figura 10. Bazo de un organismo control sano

Por otro lado está el riñón, su función principal es el balance de agua y sal y se encuentra en la parte dorsal de la cavidad del cuerpo. Se desarrolla como estructuras pareadas, que luego se fusionan. La sangre entra en los sinusoides del riñón de la aorta dorsal, y se devuelve al corazón a través de la vena cardinal posterior. El riñón anterior es delgado y los túbulos renales se extienden en el tejido hematopoyético de la cabeza del riñón, manteniendo las estructuras pareadas (Morrison *et al.*, 2006).

El riñón está formado por un conjunto de células llamadas nefronas, éstas constan de un corpúsculo renal y túbulos. El corpúsculo renal se compone de una red capilar vascular llamada glomérulo, que está rodeado por la cápsula de Bowman. La cápsula es una vesícula en el extremo del túbulo renal, que ha invaginado para formar una doble pared alrededor del glomérulo, que consiste en un epitelio parietal y visceral interior y exterior. Las arteriolas suministran sangre al glomérulo. La primera parte del túbulo, al lado del glomérulo, se compone de una región corta de las células del cuello densamente empaquetadas. El primer y segundo segmento proximal del túbulo renal rodean al corpúsculo renal (Morrison *et al.*, 2006) (Figura 11).

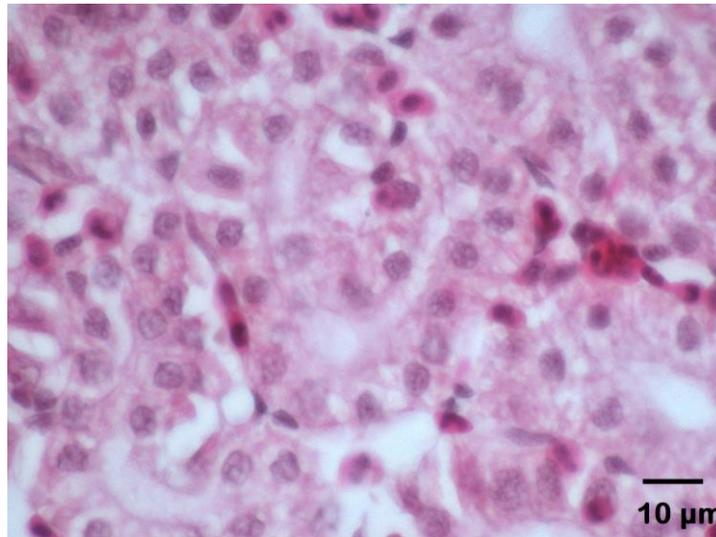


Figura 11. Zona tubular del riñón de un organismo control sano.

El hígado es un órgano grande, forma una masa anterior central justo detrás del tabique transversal, que separa el pericárdico y la cavidad abdominal (Figura 12). Este órgano está rodeado por una cápsula fina limitada por un epitelio escamoso simple, llamado mesotelio. Los hepatocitos conforman el órgano y almacenan glucógeno y grasa (Morrison *et al.*, 2006). En el centro del hígado se puede ver una gran vena central. El páncreas exocrino se

dispersa en los mesenterios alrededor del estómago y el intestino, y también penetra en el hígado (Morrison *et al.*, 2006).

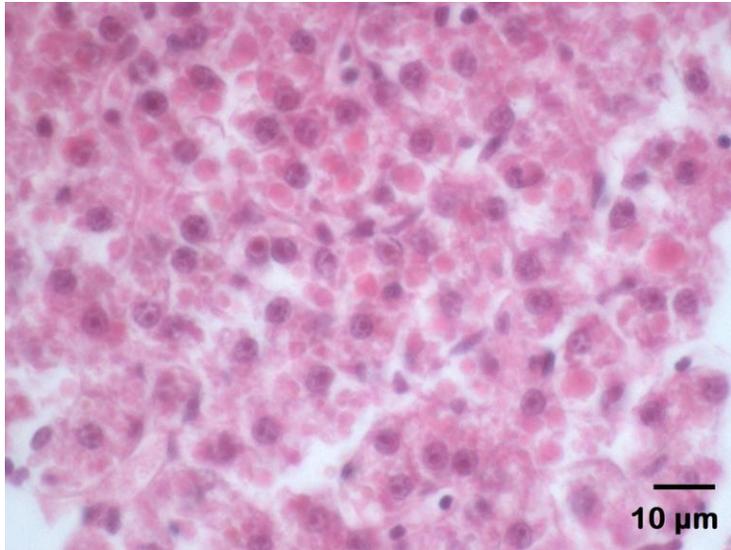


Figura 12. Corte histológico del hígado de un organismo control sano.

La vena central del hígado está bordeada por un endotelio fino, y los eritrocitos se puede ver en el lumen, los sinusoides revestidos por células endoteliales se ven en la vena central.

Otro de los órganos analizados es el cerebro el cual está formado por el par de lóbulos olfativos, el órgano pineal central, el par de tectum óptico, el cerebelo, el bulbo raquídeo y la médula espinal dorsal a la notocorda. El tectum óptico es el principal centro óptico, y aparece externamente como dos lóbulos ópticos prominentes, lo que indica que la vista es importante para la tilapia. El tejido cerebral está compuesto principalmente por neuronas y células de la glía interconectadas conformando los diferentes lóbulos antes mencionados. (Figura 13).

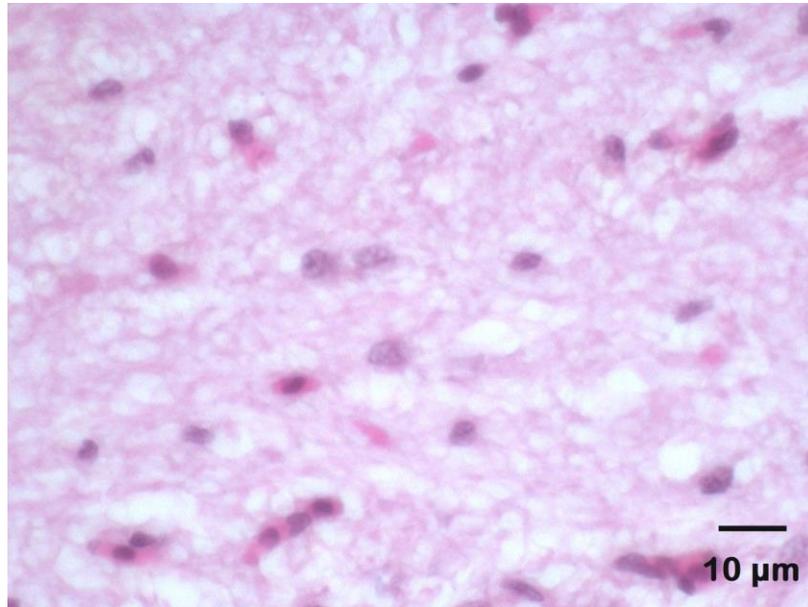


Figura 13. Zona del cerebro de un híbrido de tilapia control sano.

Los resultados del diagnóstico de los organismos inyectados vía intraperitoneal con células bacterianas de *A. dhakensis* muestran que dentro de las 2:30 h.p.i. no hubo daños en ninguno de los órganos, sin embargo a media hora después el bazo de uno de los organismos mostró necrosis multifocal de células sanguíneas en forma de picnosis pues se observan los núcleos de las células reducidos en tamaño, redondos, con coloración casi negra (basofilia), y en forma de carriorexix pues los núcleos están fragmentados y basófilos, dispersos en el lugar donde estaba el núcleo entero (Figura 14). En las muestras histológicas de los organismos colectados a las 6, 10, 12, 18 y 31 h. p.i. se observa nuevamente la necrosis de las células sanguíneas en forma de picnosis y carriorexix multifocal.

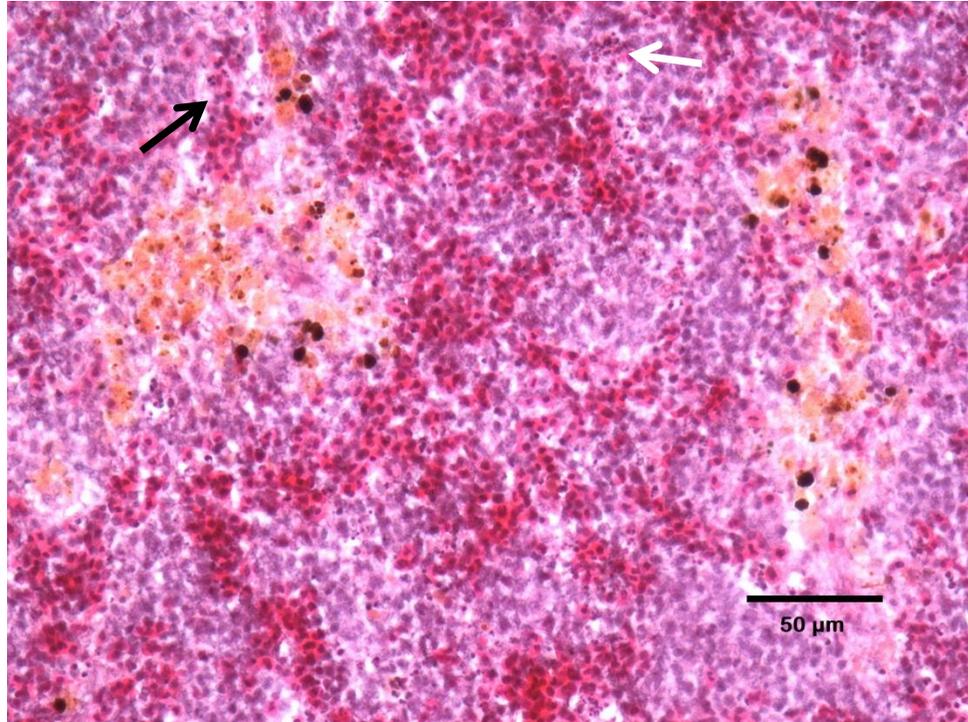


Figura 14. En la parte superior derecha (flecha blanca) se observa necrosis en forma de carriorexix dentro del bazo y en la parte superior izquierda se encuentran núcleos picnoticos (flecha negra).

En el hígado los daños comenzaron a las 3 h.p.i donde se observa inflamación multifocal detectada por la infiltración de linfocitos destacándose alrededor de vasos y capilares sanguíneos (Figura 15), además el tejido pancreático se observa con pérdida de la estructura microanatómica normal y no se distingue su núcleo. Los hepatocitos poseen un núcleo basófilo con citoplasma eosinófilo sin que se logre apreciar en ellos algún tipo de alteración. A partir de las 6 h.p.i se observa necrosis en forma de picnosis y carriorexix focal de células sanguíneas (Figura 16), e infiltración de linfocitos cerca de capilares sanguíneos. A las 7 h.p.i aumenta la necrosis de células sanguíneas y la inflamación focal del hígado continúa observándose. A las 8, 9 y 10 h.p.i el hígado presenta nuevamente células sanguíneas picnoticas y pero en menor severidad que a las 7 h.p.i., continúa detectándose inflamación focal cercana a capilares y vasos sanguíneos. A las 18 h se observa congestión multifocal difusa e inflamación focal. En el último muestreo llevado a cabo a las 31 h.p.i se detectó el desarrollo de nódulos

multifocales en tejido hepático necrótico, sin embargo no se detectaron bacterias en ellos (Figura 17).

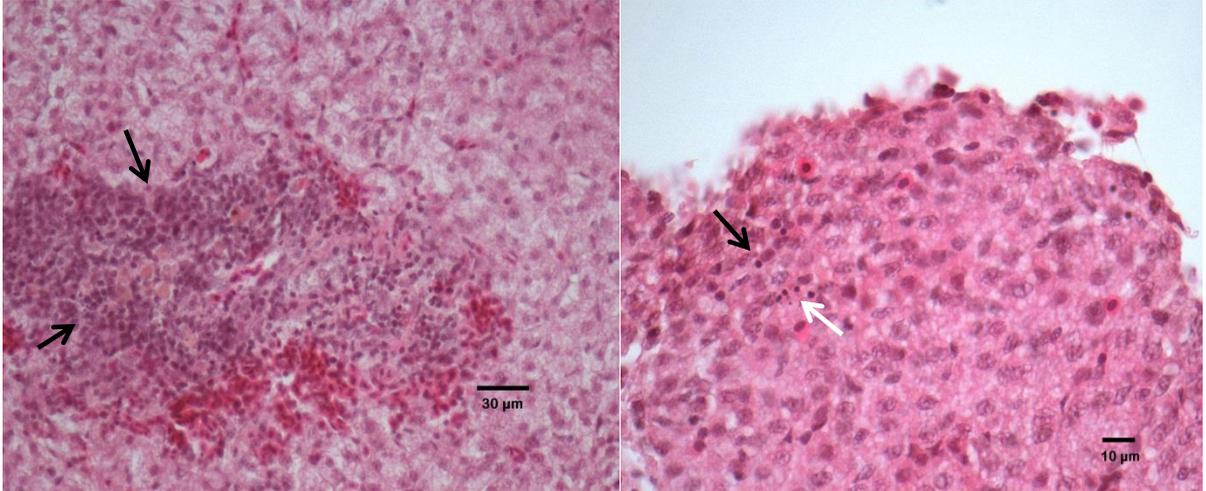


Figura 15. Inflamación presente en el hígado en zona cercana a capilares sanguíneos (flechas negras).

Figura 16. Necrosis en forma de carrionexis (flecha blanca) y picnosis (flecha negra) en células sanguíneas del hígado de tilapias 6 h.p.i

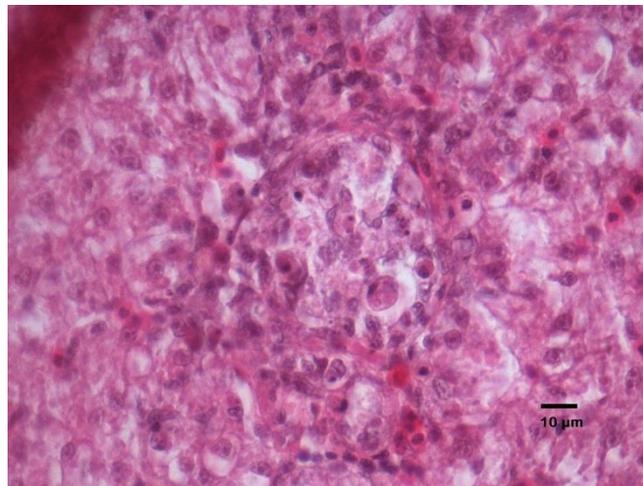


Figura 17. Detección de nódulo en tejido hepático necrótico 31 h.p.i.

En el caso del riñón se observó infiltración de linfocitos en la zona intertubular (espacio entre los túbulos), a las 5:30, 6 y 7 h.p.i . A las 8 h.p.i se

detectó necrosis en forma de picnosis de células sanguíneas (Figura 18) en la zona intertubular del riñón. 9 h.p.i aumenta la picnosis y se observa también carrierrexis intertubular de células sanguíneas (Figura 18), además de que se observa degeneración hialina caracterizada por la aparición de un área hialina con pérdida de la estructura y homogénea fuertemente acidofílica, la hialinización es un proceso degenerativo, por lo que el tejido pierde su función. Durante los muestreos de las 18 h.p.i continúa presente la picnosis y carrierrexis de células sanguíneas, sin embargo a las 10 y 31 h.p.i sólo se observa inflamación focal a moderada y congestión leve.

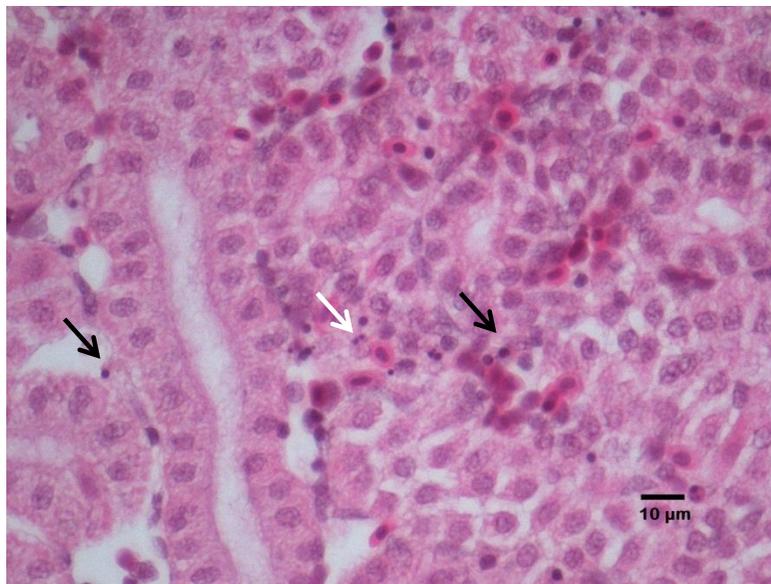


Figura 18. Picnosis intertubular presente en el riñón y necrosis en forma de carrierrexis 9 h.p.i

El cerebro por su parte presentó picnosis y carrierrexis focal leve de células sanguíneas a las 7, 8, 9 y 10 h.p.i. Para las 18 y 31 h.p.i la picnosis de células sanguíneas incrementó en severidad a moderado-severo (Figura 19).

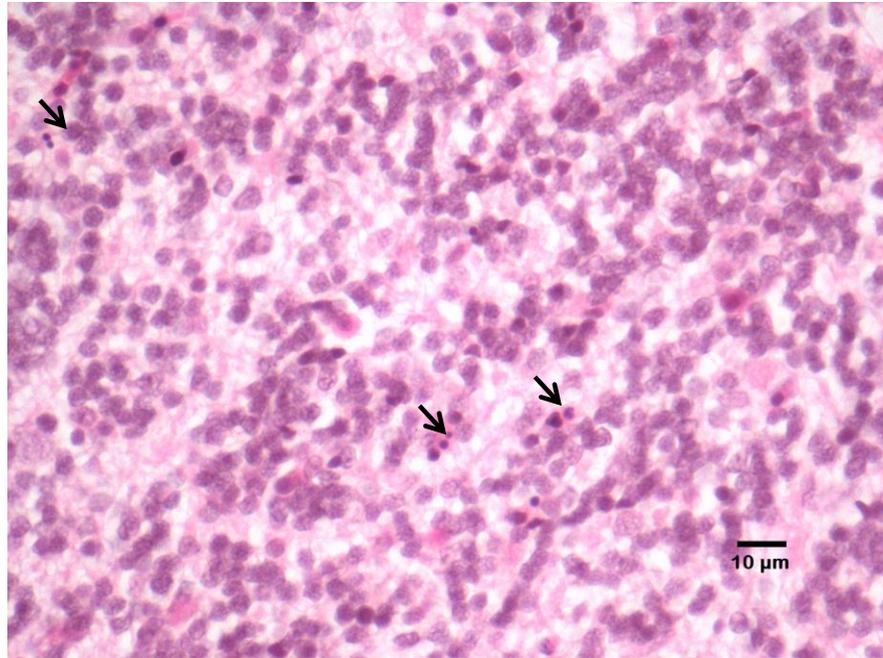


Figura 19. Necrosis en forma de picnosis en células sanguíneas del cerebro 18 h.p.i. Durante la tinción de Giemsa que se llevó a cabo especialmente para detectar la presencia de las células bacterianas de *A. dhakensis*, estas se observaron desde las 3 h.p.i hasta las 31 h.p.i tanto en hígado, tejido pancreático, bazo y riñón (zona intertubular y cabeza del riñón) tal y como se observa en las Figuras 20, 21 y 22.

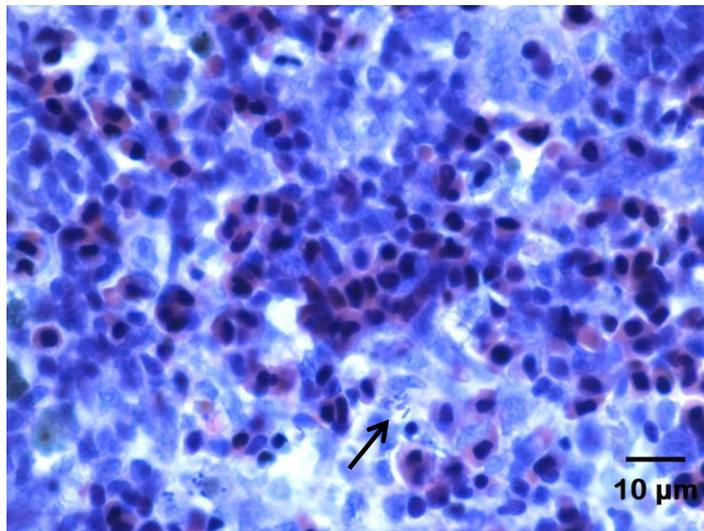


Figura 20. Células bacterianas de presentes en bazo de híbridos de tilapia a las 3 h.p.i.

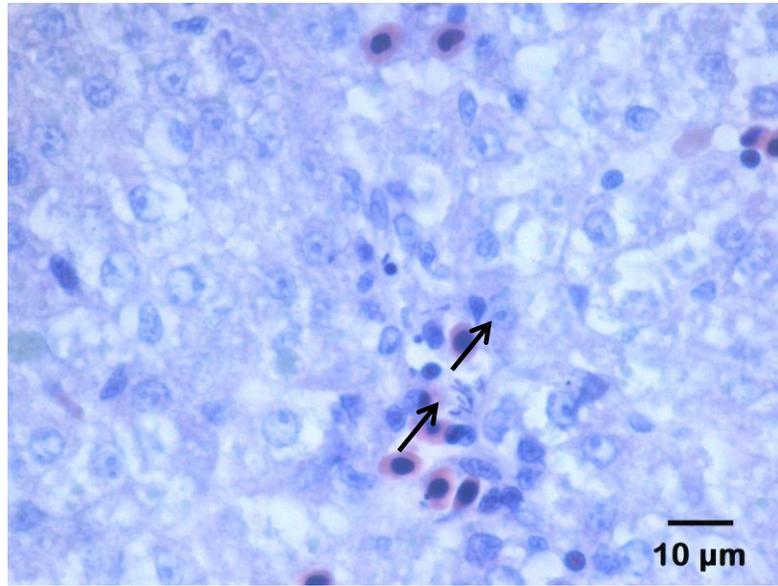


Figura 21. Presencia de células bacterianas en hígado de híbridos de tilapia infectados a las 6 h.p.i.

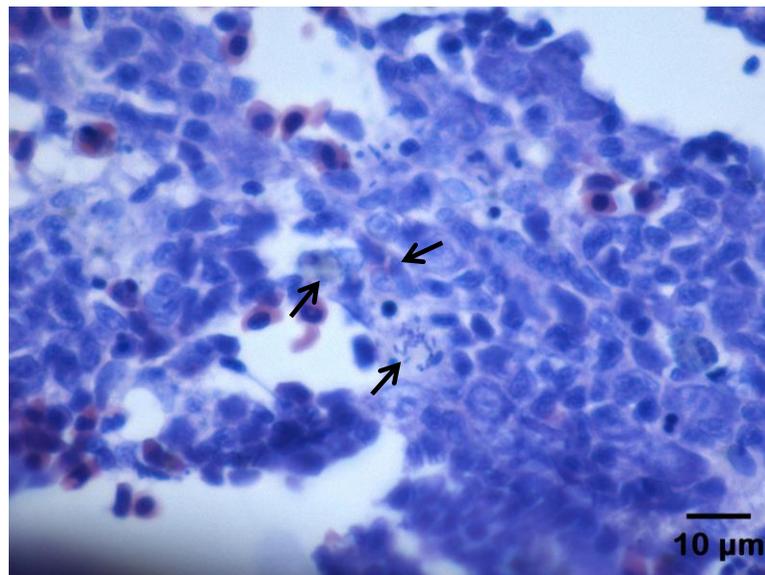


Figura 22. Detección de células bacterianas en el riñón (cabeza) en híbridos de tilapia a las 8 h.p.i.

En la infección por vía intraperitoneal con PECs de *Aeromonas dhakensis* los daños mostrados histológicamente empezaron a ser visibles a partir de las 2 h.p.i donde se observa necrosis de células sanguíneas en forma de picnosis en diversas partes del tejido del bazo así como carrierexis multifocal. A las 4

h.p.i se observa una zona focal con núcleos picnoticos y para las 6 h.p.i además de picnosis se observa necrosis en forma de carriorex. A las 10 y 24 h.p.i no se observan alteraciones visibles en este órgano.

En hígado se observó a las 2 h.p.i inflamación leve (Figura 23) y congestión moderada, para las 4 h.p.i persistía la inflamación pero ya de forma moderada a severa. A las 6 h.p.i se observó la presencia de núcleos picnóticos (focal) de células en el hígado, permaneciendo la inflamación leve hasta las 24 h.p.i.

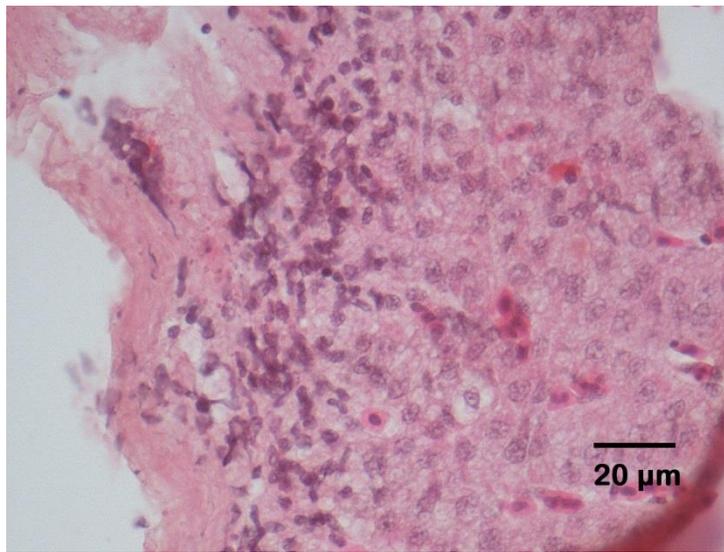


Figura 23. Inflamación leve presente en el hígado después de 2 h.p.i con PECs de *A. dhakensis*.

Por otro lado en el riñón a las 2 h.p.i se observa inflamación focal a moderada detectada por la infiltración de linfocitos en una zona intertubular, además se observa congestión moderada y picnosis focal intertubular. A las 6 h.p.i se detectó necrosis focal en forma de picnosis de células sanguíneas en la zona intertubular del riñón. En los muestreos realizados 10 y 24 h.p.i no se observaron alteraciones.

En el cerebro se observó que a las 2 h.p.i inició la inflamación focal permaneciendo hasta las 6 h.p.i ya que después de las 10 y 24 h.p.i no se observaron daños aparentes.

### 6.3.5 Identificación molecular del agente causal por rep-PCR

Para cumplir uno de los postulados de Koch, se realizó la identificación del agente causal aislado de los órganos hígado, bazo, riñón y cerebro de organismos moribundos durante la infección experimental con células de *A. dhakensis* y comprobar que la muerte fue causada por la bacteria.

Con la imagen obtenida después de la electroforesis se puede observar en la Figura 24 que las bandas de los carriles 2 al 8 son iguales al control positivo (*A. dhakensis*) localizado en el carril 9. Comprobando que en las muestras de hígado, riñón y bazo estaba presente la bacteria inoculada.

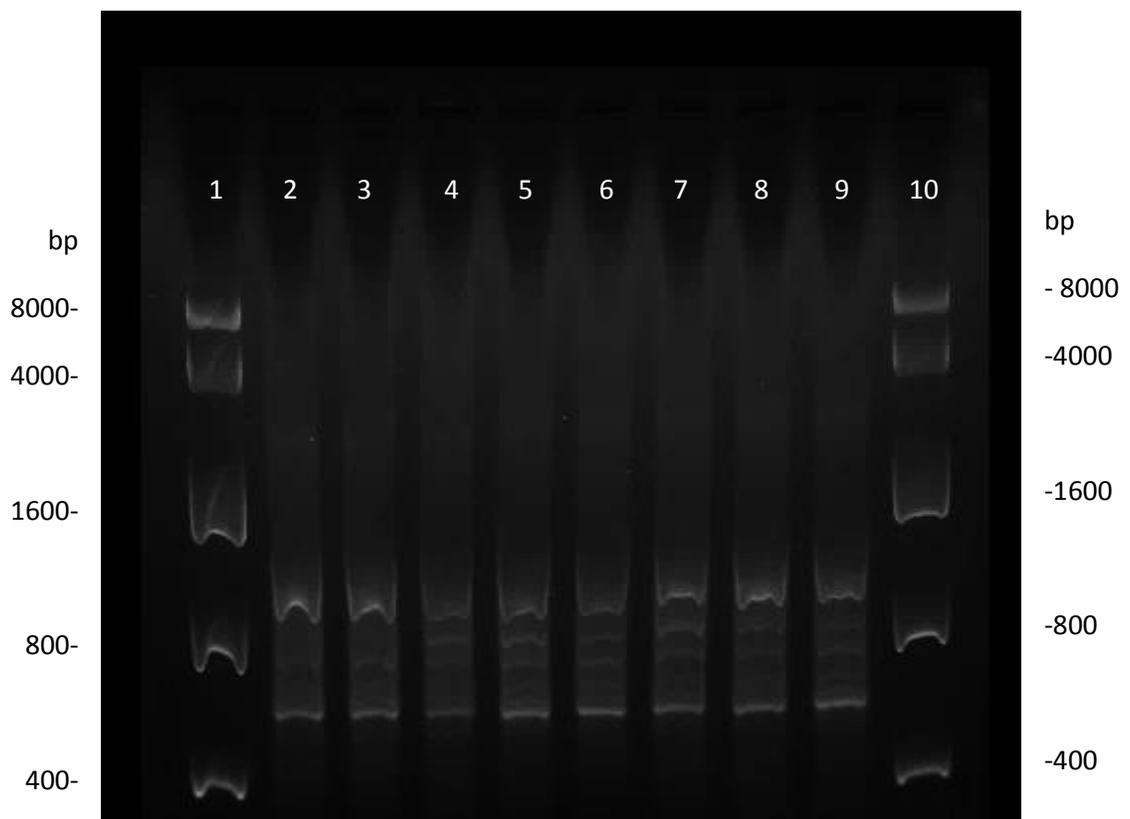


Figura 24. Carril 1 y 10: Marcador molecular. Carril 2 y 6: Riñón. Carril 3 y 7: Bazo. Carril 4 y 8: Hígado. Carril 5: Cerebro. Carril 9: control positivo *A. dhakensis*

### **6.3.6 Tinción Gram y motilidad**

Los aislados se purificaron y se identificó el tipo de pared celular que presentaban así como su motilidad. Los aislados bacterianos obtenidos a partir de los órganos riñón, hígado, bazo y cerebro de organismos infectados después de 5, 5:30, 6, 6:30, 7:30, 8, 9, 10 y 31 h.p.i resultaron ser bacilos Gram negativos además de que todos presentaron motilidad.

## VII. DISCUSIONES

Como se ha mencionado anteriormente el género *Aeromonas* se ha reconocido como un agente causal de enfermedades de varias especies de peces. Los mecanismos de patogenicidad en las infecciones causadas por especies de este género no se han establecido con exactitud, sin embargo, se han logrado identificar un gran número de estructuras y enzimas extracelulares consideradas factores de virulencias de *Aeromonas* (Castro-Escarpulli, 2002).

La clasificación de las especies de este género ha dependido de una mezcla de datos fenotípicos y genéticos. Vega-Sanchez *et al.* (2013) observo el crecimiento de *A. hydrophila*, *A. alosaccharophila*, *A. bestiarum*, *A. encheleia*; *A. eucrenophila*, *A. media*, *A. popoffii*, *A. salmonicida*, *A. sobria*, *A. veronii* *bv. sobria*, *A. veronii* *bv. veronii* a una concentración del 0% de NaCl, pero su crecimiento se inhibió totalmente a una concentración del 6%. Además Hanze *et al.* (1978); Hanze *et al.* (1979); Janda y Abbot (2010) en un estudio señalan que especies de *Aeromonas* como *A. hydrophila* y *A. caviae* son capaces de crecer en amplios rangos de temperatura (25-35°C). Mientras que Soto-Rodríguez *et al.* (2013) y Beaz *et al.* (2013) definen a *Aeromonas dhakensis* c510m como una bacteria Gram negativa que presenta motilidad, oxidasa y catalasa positiva, reducen nitrato a nitrito, y son resistentes al agente vibriostático O/129. Lo anterior coincide ampliamente con los resultados obtenidos en el presente estudio ya que se observó que *A. dhakensis* es capaz de crecer en una concentración de 0 al 5.5% de NaCl, inhibiéndose a partir de una concentración del 6% de NaCl. Además el rango de temperatura a la que creció fue entre 20 y 37°C.

Se puede inferir entonces que al ser *A. dhakensis* una especie perteneciente a *Aeromonas* comparte características fenotípicas similares a otras especies de este género, convirtiéndose en una bacteria capaz de crecer, desarrollarse y adaptarse a una gran variedad de ambientes.

En cuanto a la patogenicidad de *Aeromonas* existen estudios que han establecido sus mecanismos, sin embargo aún no se ha llegado a concluir un factor que sea predominante (Janda y Abbott, 2005; Von, 2007). Cabrera *et al.* (2007) señalan que los factores de virulencia que se relacionan a estos mecanismos son la producción de enzimas extracelulares, exotoxinas y adhesinas las cuales parecen jugar un papel importante en la patogenicidad de estas bacterias. Estudios realizados por Farmer *et al.* (2006); Hu *et al.* (2012) reportan que *A. hydrophila* y *A. caviae* son especies de *Aeromonas* que producen varios productos extracelulares tales como proteasas, hemolisinas, enterotoxinas citolíticas los cuales están relacionados con su patogenicidad.

En este estudio las células bacterianas de *A. dhakensis* presentaron  $\beta$ -hemolisis. Lo anterior concuerda con lo reportado por Rey *et al.* (2009) pues señalan que *A. hydrophila* presenta  $\beta$ -hemolisis relacionándola a una amplia gama de funciones biológicas como la actividad proteolítica y la actividad hemolítica las cuales son letales para los peces, además relacionan a la actividad hemolítica a la enterotoxigenicidad, siendo la aerolisina la hemolisina más estudiada. Por otro lado Namdari y Bottone (1990) en su estudio consideran la producción de toxinas hemolíticas como una evidencia del potencial patógeno en bacterias del género *Aeromonas*. Los daños necróticos como picnosis y carrierrexis mostrados en las células sanguíneas de los órganos de los organismos infectados con células bacterianas de *A. dhakensis* confirma la hemolisis mostrada *in vitro* pues se interpreta como un sinónimo de dicha actividad hemolítica, aunque durante el diagnóstico se demuestra que dicha hemólisis inició desde el primer muestreo llevado a cabo a las 3 h.p.i

En el caso de los PECs de *A. dhakensis* el resultado fue negativo, es decir no presentaron  $\beta$ -hemolisis, lo cual difiere con lo reportado por Soto-Rodríguez *et al.* (2013) quienes demostraron actividad hemolítica en PECs de *A. dhakensis*, sin embargo cabe mencionar que durante el análisis histológico en el presente estudio los productos extracelulares de *A. dhakensis* presentaron actividad hemolítica en los tejidos analizados. Esto puede deberse a que durante la realización de la técnica la cantidad de PECs inoculada no fue la necesaria para alcanzar a expresar dicha actividad. La actividad hemolítica es con frecuencia compleja y no siempre debida a una enzima proteolítica únicamente, pues a menudo interviene una toxina de naturaleza lipoproteica (García *et al.*, 1994).

Es importante considerar que las bacterias pueden no producir los mismos factores de virulencia *in vitro* e *in vivo*, se puede dar el caso que las proteínas bacterianas que se expresan durante el crecimiento en un medio de cultivo no sean necesariamente las mismas que aquellas que se expresan dentro del huésped (Toranzo y Barja, 2000). Además se puede destacar que una enfermedad es el resultado de una interacción patógeno-hospedero-ambiente, por lo que el estado inmunológico y fisiológico del hospedero ejerce un papel determinante en el desenlace de la enfermedad (Smith, 1984).

Otro de los factores relacionados con la virulencia de *Aeromonas spp.* es la actividad proteolítica, en este trabajo la actividad proteolítica fue de 0.52 U/ml, lo cual concuerda parcialmente con lo reportado por Soto *et al.* (2013) quienes obtuvieron resultados entre 0.45 y 1.23 U/ml a partir de aislados pertenecientes al género de *Aeromonas*: *A. ichtiosmia*, *A. dhakensis*, *A. popoffii*, *A. allosaccharophila*, *A. veronni*, *A. ichtiosmia*. Dichos niveles de actividad proteolítica han sido relacionados con su capacidad para inducir a patologías en diversas especies de peces, asociando su patogenicidad con la secreción de potentes proteasas. Entre las dos principales actividades proteolíticas extracelulares detectadas en *Aeromonas* se ha descrito como

responsables a una proteasa termoestable de 38 kDA y una serina proteasa termolábil de 68 kDA (Rivero *et al.*, 1991). Estas proteasas se vinculan con la propagación de las bacterias dentro del huésped degradando el moco de la superficie de los peces, causando daño en el tejido y facilitando la invasión bacteriana en las células hospedadoras.

Suarez y Herrera (2012) demostraron que el 50% de cepas aisladas de *A. hydrophila* fueron proteolíticas mientras que en un estudio realizado por Guerra *et al.* (2007) reportan que el 100% de cepas de *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii* biovar *sobria* aisladas de pacientes con diarrea demostraron actividad proteolítica con valores de 9, 1.2 y 0.75 U/ml respectivamente. Otro estudio de Ipsita *et al.* (2012) demostró que los productos extracelulares de *A. hydrophila* presentaron una alta actividad proteolítica (30 U/ml) cuando su cultivo se llevó a cabo a una temperatura de 30°C, mientras que al ser cultivados a 35°C presento una actividad proteolítica menor (10 U/ml). Es evidente la relación entre la actividad proteolítica y la virulencia de las cepas bacterianas, sin embargo no se ha demostrado una correlación real entre ambas.

Con relación a la citotoxicidad se comprobó que los PECs de *A. dhakensis* poseen un efecto citotóxico sobre la línea celular 3T3L1, las concentraciones de 5 y 10 mg/ml de PECs causaron la muerte de estas células en un 54 y 55% respectivamente. Lo anterior concuerda Chi-Jung *et al.* (2012) estudio donde se demostró la citotoxicidad de *A. hydrophila* y *A. aquariorum* (= *A. dhakensis*) empleando la línea celular HT-29 causando muerte celular del 85 y 90% respectivamente, estos resultados pueden relacionar con las citotoxinas que poseen las bacterias del genero *Aeromonas* y que además tienen la capacidad de degradar células del hospedero lo cual facilita la proliferación de células patógenas.

Morinaga *et al.* (2013) también demostraron la presencia de actividad citotóxica sobre la línea celular THP-1 (línea de monocitos humanos) y HL-60 (promioblastos humanos de sangre periférica) por parte de *A. hydrophila* y

*A. aquariorum* (= *A. dhakensis*). Dicha citotoxicidad la relacionan con la capacidad de estas bacterias para sintetizar distintas toxinas que provocan alteraciones letales en las células del hospedero de acuerdo al grado de susceptibilidad del huésped a la acción de dicha toxina. Estas alteraciones son evidenciadas por el daño estructural y morfológico que sufre la célula, induciendo en muchos casos la muerte de ésta.

Otro factor de virulencia examinado en *A. dhakensis* (CAIM 1873) es la producción de sideróforos. En este estudio la producción de sideróforos de *A. dhakensis* fue de 0.26  $\mu\text{M}$  de sideróforos por  $10^8$  UFC/ml de bacteria, Soto-Rodríguez *et al.* (2013) detectaron la presencia de sideróforos utilizando el método cualitativo CAS en *A. dhakensis*, mientras que, Gierer *et al.* (2006) reportan que cepas de bacterias patógenas aisladas de peces incluyendo a *A. hydrophila*, *A. caviae*, *Pseudomonas fluorescens* y *P. putida* tuvieron una producción de sideróforos de 0.37  $\mu\text{M}$ , 0.52  $\mu\text{M}$ , 0.44  $\mu\text{M}$  y 0.5  $\mu\text{M}$  respectivamente, ellos señalan que la capacidad de producir sideróforos esta correlacionada con una mayor virulencia en especies de *Aeromonas* facilitando el crecimiento de estas bacterias y además de que participan en la producción de otros factores de virulencia como en la aparición de actividad hemolítica y proteolítica.

Sin embargo Zywno *et al.* (1992) reportó que la patogenicidad de *A. hydrophila* no siempre está acompañada por la presencia de sideróforos, ya que muchas bacterias los producen simplemente para poder sobrevivir en el huésped (Alavandi y Ananthan, 2003). Cabe resaltar que existen bacterias que incrementan la eficiencia de producción de sideróforos, secretando algunas enzimas como las hemolisinas, que lisan a los eritrocitos liberando un contenido celular rico en hemoglobina o proteasas que tienen la capacidad de degradar proteínas transportadoras de hierro (Genco y Dixon, 2001).

La producción de enzimas extracelulares por bacterias patógenas para organismos acuáticos ha sido reportada, sin embargo el papel de estas exoenzimas en su patogenicidad no está bien definido. Soto-Rodríguez *et al.*

(2013) reportaron mortalidad del 100% de tilapia *Oreochromis mossambicus* y *Solea vulgaris* en infecciones vía IP tanto con células bacterianas como con PECs de *A. dhakensis*, ellos atribuyen esto a la presencia de factores de virulencia que son letales para los peces tales como gelatinasa, DNasa, lipasas y actividad citotóxica y hemolítica. Mientras que en este trabajo se obtuvieron resultados similares pues tanto las células como los PECs de la cepa *A. dhakensis* (CAIM 1873) causaron mortalidad a híbridos de tilapia (*O. niloticus* x *O. mossambicus*) por un lado las células lo logran entrando al sistema, multiplicándose para colonizar e invadir al organismo logrando su mortalidad, además de que las bacterias Gram negativas suelen tener endotoxinas como componente de su pared celular que al ser liberadas provocan efectos tóxicos en el huésped, mientras que los PECs poseen factores de virulencia que son letales para los peces como actividad citotóxica y proteolítica así como de sideróforos.

Rey *et al.* (2009) reportan resultados similares a los anteriores pues ellos infectaron vía IP con células bacterianas y PECs de *A. hydrophila* a peces cachama blanca *Piaractus brachipomus* y a híbridos de tilapia *Oreochromis spp.* y ambos resultaron ser patógenos causando mortalidades en ambas especies de peces, al igual que Ipsita *et al.* (2011) quienes reportaron que tanto las células bacterianas como los PECs de *A. hydrophila* fueron patógenos para carpa Rohu (*Labeo rohita*), aunque cabe resaltar que ellos obtuvieron una mortalidad del 100% primero en los peces infectados con PECs (12 h.p.i) que en los infectados con células bacterianas (24 h.p.i) lo cual puede demostrar que los productos extracelulares de esta bacteria actúan de manera directa y letal sobre el organismo gracias a los factores de virulencia que posee haciendo que causen mortalidad más rápido que sus propias células. Lo contrario sucedió en un estudio de Pridgeon y Klesius (2011) quienes reportaron que la virulencia de aislados de *A. hydrophila* prevalece en las células bacterianas y no en sus PECs pues al inyectar vía IP en bagres una dosis de  $1.7 \times 10^6$  cel/g se obtuvo una mortalidad del 100%

mientras que al inyectar 100 µl PECs (0.240 µg de proteína) solo se presentó una mortalidad del 20%.

Los signos clínicos observados en las infecciones con células bacterianas y PECs de *A. dhakensis* fueron similares en ambos casos pues se observaron zonas hemorrágicas, letargia, anorexia, nado errático e inflamación de la zona abdominal. Lo anterior coincide parcialmente con lo reportado por Soto-Rodríguez *et al.* (2013) con infecciones en tilapia *Oreochromis mossambicus* utilizando la misma cepa de *A. dhakensis* los cuales fueron nado errático, inflamación del abdomen, letargia y oscurecimiento de la piel; en el lenguado (*Solea vulgaris*) observaron nado errático y oscurecimiento de la piel. Los signos clínicos mostrados en el presente trabajo se infieren a que la bacteria pertenece al género de *Aeromonas* y suelen causar ulceración en diferentes zonas, heridas, hinchazón o inflamación abdominal así como en los tejidos. Wang *et al.* (2003) sugirieron que la citotoxicidad y los daños causados en peces por especies de *Aeromonas* y sus PECs puede ser multifactorial y que los productos extracelulares ( $\beta$ -hemolisinas, proteasas, DNasas, enterotoxinas) tienen la capacidad de actuar solos o en conjunto.

Además de los signos clínicos mostrados durante las infecciones, en el análisis histológico se observó necrosis en forma de picnosis y cariorrexis de células sanguíneas en bazo, cerebro, riñón e hígado, este último también mostró inflamación y además en el riñón se detectó degeneración hialina cuando los organismos fueron infectados con células bacterianas de *A. dhakensis* mientras que con los PECs hubo picnosis de células sanguíneas en bazo, hígado y riñón; en el cerebro solo se observó inflamación. En estos resultados se observa que los daños histopatológicos causados por las células bacterianas fueron mayores que los ocasionados por los PECs de *A. dhakensis*, esto puede deberse a que al inyectar las células entran al organismo y se multiplican y distribuyen circulando a través de los vasos sanguíneos superando su sistema inmune hasta llegar a sus órganos, por lo que los daños son más severos, además es posible que las células

bacterianas utilicen mecanismos de patogenicidad para dañar al organismo. Sin embargo la mortalidad causada por los PECs ocurrió de manera más rápida, esto sugiere la presencia de factores de virulencia altamente tóxicos y al estar en contacto directo sobre los híbridos de tilapia sus efectos tóxicos se reflejan en la muerte de los organismos.

Rey *et al.* (2009) presentaron datos similares al reportar que las células de *A. hydrophila* causaron mayores daños (necrosis del páncreas, intestino y musculo) que sus PECs que solo causaron inflamación en hígado, al igual que Lamas *et al.* (1994) quienes reportaron mayores daños histológicos al infectar trucha arco iris con células bacterianas que con los PECs de *V. anguillarum*.

Es importante mencionar que durante las infecciones preliminares vía inmersión tanto con células como con PECs, las mortalidades se presentaron tanto en los grupos infectados como los grupos control, posiblemente, la adición del PBS produce una proliferación de bacterias en el agua causando su descomposición. De acuerdo a los resultados obtenidos, se sugiere que mediante la vía de infección con *A. dhakensis* por inmersión no es posible reproducir la enfermedad en híbridos de tilapia, ya que no permite observar los signos clínicos ni mortalidad pues no hubo diferencias en cuanto a mortalidad ya que tanto los grupo control como los infectados murieron.

Como se ha mencionado anteriormente el género *Aeromonas* incluye especies que son consideradas patógenos en acuicultura, por lo que el estudio de agentes antimicrobianos puede ayudar a controlar o eliminar las enfermedades infecciosas que causan. Vega-Sánchez *et al.* (2014) demostraron a través del método de difusión en disco que aislados de *A. hydrophila*, *A. popoffii*, *A. veronii*, *A. salmonicida* y *A. sobria* presentan sensibilidad a Gentamicina (10 µg), Ceftriaxona (30 µg), Netilmicina (30 µg) y Amicasina (30 µg), ellos atribuyen esta resistencia a que a que estos antibióticos pertenecen al grupo de aminoglucósidos los cuales son

bacteriostáticos que detienen el crecimiento bacteriano actuando sobre sus ribosomas y provocando la producción de proteínas anómalas, creando porosidades en la membrana externa de la pared celular bacteriana. Lo anterior coincide con el presente estudio ya que *A. dhakensis* resultó ser sensible también a Gentamicina (10 µg) además de serlo ante Norfloxacin (30 µg), Enrofloxacin (2 µg), Florfenicol (5 µg) y Oxitetraciclina (10 µg), lo cual se debe a que son antibióticos que pertenecen al grupo de agentes bacteriostáticos que impiden la reproducción bacteriana además actúan principalmente contra bacilos y cocos Gram negativos como es el caso de *A. dhakensis*.

Por otro lado *A. dhakensis* mostró resistencia a Eritromicina (5µg) y Sulfametoxazol (10 µg) coincidiendo en gran medida con lo reportados por Castro-Escarpulli *et al.* (2003) quienes demostraron que aislados de *Aeromonas* a partir de pescado congelado mostraron resistencia a Cefalotina, Cloranfenicol, y Sulfametoxazol+Trimetoprima, además Figueras *et al.* (2012) también concuerdan en la resistencia de aislados de *A. aquariorum* (= *A. dhakensis*) a partir de sangre frente a antibióticos de Sulfametoxazol, Amoxicilina y Amoxicilina-Ac. clavulánico. Dicha resistencia la atribuyen principalmente a que estos antibióticos actúan de mejor manera sobre bacterias Gram positivas aunque en grandes cantidades también pueden generar sensibilidad ante bacterias Gram negativas como es el caso de *A. dhakensis*.

Mientras tanto Herrera *et al.* (1984) evaluaron la concentración mínima inhibitoria (MIC) a la cual una bacteria deja de crecer, ellos aislaron una cepa de *A. hydrophila* a partir de niños enfermos de diarrea la cual presento una MIC de 0.3 µg/ml de Gentamicina, mientras que Wu *et al.* (2012) demostraron una MIC <1 µg/ml de Gentamicina para *A. aquariorum* (= *A. dhakensis*), lo anterior coincide con lo reportado en el presente estudio pues se obtuvo una MIC de 0.3 µg tanto de Gentamicina como de Oxitetraciclina

para *A. dhakensis*, como ya se mencionó anteriormente son antibióticos bacteriostáticos que impiden el crecimiento bacteriano causando la formación de poros en la membrana de las paredes bacterianas.

Por otro lado Leszek y Alicja (2004) demostraron que la MIC para aislados de *A. hydrophila* a partir de carpas cultivadas (*Cyprinus carpio L.*) fue de 0.5 µg/ml de Oxitetraciclina coincidiendo parcialmente con lo demostrado en este estudio, aunque es evidente que la sensibilidad a los antimicrobianos varía entre cepas de la misma especie bacteriana, por ello la importancia de realizar esta prueba con las cepas de interés.

## VIII CONCLUSIONES

- La cepa *A. dhakensis* CAIM 1873 crece en concentraciones entre 0.0 y 5.5% de NaCl, a un pH desde 4 a 10 y una temperatura entre los 4 y 37°C, por lo tanto *A. dhakensis* es una bacteria con capacidad para adaptarse y desarrollarse tanto a temperaturas bajas como altas, en ausencia y presencia de sal así como en pH ácido y alcalino.
- *A. dhakensis* CAIM 1873 es una cepa susceptible al antibiótico de gentamicina y oxitetraciclina con una MIC de 0.3 µg/ml y resistente al sulfametoxazol, florfenicol, norfloxacin y eritromicina.
- La citotoxicidad presente en los PECs de *A. dhakensis* CAIM 1873 tiene un papel importante en la patogenicidad que posee, la misma viene dada por la capacidad de ésta de sintetizar distintas toxinas que provocan alteraciones letales en las células del hospedero, de acuerdo al grado de susceptibilidad del huésped a la acción de dicha toxina, estas alteraciones pueden ser evidenciadas por las mortalidades presentadas en las 12 h.p.i con PECs de *A. dhakensis*.
- La infección vía inmersión con *A. dhakensis* CAIM 1873 no se consideró como una ruta de infección debido a que los grupos control presentaron mortalidades.
- La virulencia de *A. dhakensis* se puede relacionar con la secreción de sus PECs, aunque los daños histopatológicos fueron mayores cuando se inyectaron intraperitonealmente las células bacterianas comparado con los PECs de *A. dhakensis*. La mortalidad fue también más rápida al infectarse con PECs, lo cual se debe a la presencia de factores de virulencia como proteasas, sideróforos, lipasas, DNAsas y actividad citotóxica.

- *A. dhakensis* fue identificada como el agente causal de la infección por células bacterianas a través de la rep PCR

## IX. RECOMENDACIONES

Estudios posteriores deben ser dirigidos a la comprensión e identificación de los factores de virulencia presente en los PECs de *A. dhakensis* relacionados con la mortalidad de los híbridos de tilapia. Además se deben realizar infecciones con periodos de exposición más largos y dosis de células bacterianas y PECs más bajas que permitan que se lleve a cabo el desarrollo de la infección y se exprese la respuesta a nivel microanatómico en cada uno de los órganos de la tilapia.

Durante el proceso infeccioso se presenta una interacción entre hospedero-microorganismo, por lo cual cada día se debe tratar de comprender mejor, utilizando los avances en el estudio sobre patogénesis molecular, con técnicas como la PCR y la secuenciación del ADN entre muchas otras.

## X. BIBLIOGRAFÍA

Abd-El-Rhman A.M. 2009. Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish Shellfish Immunol 27:454-459.

Al-Harbi A.H. and Uddin N. 2005. Microbiological quality changes in the intestine of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*). Let Appl Microbiol 40:486–490.

Alavandi S.V. and Ananthan S. 2003. Biochemical characteristics, serogroups, and virulence factors of *Aeromonas* species isolated from cases of diarrhoea and domestic water samples in Chennai. Indian J Med Microbiol 21: 233-238.

Aravena-Román M., Harnett G.B., Riley T.V., Inglis T.J. and Chang B.J. 2011. *Aeromonas aquariorum* is widely distributed in clinical and environmental specimens and can be misidentified as *Aeromonas hydrophila*. J. Clin. Microbiol. 49:3006–3008.

Austin B. and Austin D.A. 2007. Bacterial Fish Pathogens, Disease of Farmed and Wild Fish, 4th edn. Springer-Praxis, Chichester.

Bakopoulos V., Peric Z., Rodger H., Adams A. and Richards R.H. 2003. First report of fish pasteurellosis from Malta. J. Aquat. Anim. Health 9:26-33.

Balebona M.C, Andreu M., Zorrilla I., Morinigo M.A. and Borrego, J.J. 1998. Pathogenicity of *Vibrio Alginolyticus* for cultured gilt-head sea bream (*Sparus aurata*). Applied and Environmental microbiology 64:4269-4275.

Barghouthi S., Young R. and Olson M.O.J. 1989. Amonabactin, a novel tryptophan or phenylalaninecontaining phenolate siderophore in *Aeromonas hydrophila*. J Bacteriol 171:1811–1816.

Beaz-Hidalgo R. and Figueras M.J. 2012. Molecular detection and characterization of furunculosis and other *Aeromonas* fish infections. Health and Environment in Aquaculture 11:97–132.

Beaz H. R., Martinez M.A. and Figueras M.J. 2013. Reclassification of *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* Huys et al. 2002 and *Aeromonas aquariorum* Martinez-Murcia et al. 2008 as *Aeromonas dhakensis* sp. nov. *comb nov.* and emendation of the species *Aeromonas hydrophila*. Systematic and Applied Microbiology 36:171-176.

Beaz H.R. and Figueras M.J. 2013. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. Journal of fish diseases 36:371-388.

Bernoth E.M., Ellis A., Midtlyng P., Olivier G. and Smith P. 1997. Furunculosis Multidisciplinary Fish Disease Research 9:11-15.

Brandi G.M., Sisti G., Schiavano F., Salvaggio L. and Albano A. 1996. Survival of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* and *Aeromonas sobria* in soil. J. Appl. Bacteriol 81:439–444.

Brenden R.A. and Janda, J.M. 1987. The interaction of complement components with *Aeromonas* species. Can. J. Microbiol. 32:1-3.

Bruland K., Donat J. and Hutchins D. 1991. Interactive influences of bioactive trace metals on biological production in oceanic waters. Limnology and oceanography 8(36):1555-1577.

Cabrera L.E., Bravo L., Ramírez M.M., Llop A., Fernández A., Morier L. y Borrego G. 2007. Factores de virulencia en cepas de *Aeromonas* spp. aisladas de pacientes con bactericemia. Rev Panam Infectol 9(4):19-23.

Canals R., Vilches S., Wilhelms M., Shaw J.G., Merino S. and Tomas J.M. 2007. Non structural flagella genes affecting both polar and lateral flagella-mediated motility in *Aeromonas hydrophila*. Microbiology 15:1165–1175.

Candan A., Kücük M. and Karatas S. 1995. Motile aeromonad septicaemia in *Salmo salar* cultured in Black Sea in Turkey. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 15:195–196.

Castro-Escarpulli G., Figueras M.J., Aguilera-Arreola G., Soler L., Fernández-Rendón E., Aparicio G. O., Guarro J. and Chacón M.R. 2003. Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. Int.J.Food Microbiol. 84(2): 41–49.

Castro-Escarpulli Graciela, Aguilera-Arreola Ma. Guadalupe, Giono C. Silvia, Hernandez-Rodriguez Cesar Hugo, Rodriguez Chacon M., Soler Falgas Lara, Aparicio Ozores Gerardo, Figueras Salvar Maria Jose. 2002. El genero *Aeromonas* ¿Un patógeno importante en México? Enf. Infec. Y Micro. 22(4): 206-216.

Chaco'n M.R., Figueras M.J., Castro-Escarpulli G., Soler L. and Guarro J. 2003. Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. *Antonie van Leeuwenhoek* 84:269–278.

Chavira R., Burnett T. and Hageman, J. 1984. Assaying proteinases with azocoll. *Anal Biochem* 136: 446-450.

Chopra A.K., Houston C.W., Peterson J.W. and Jin G.F. 1993. Cloning, expression and sequence analysis of a cytolytic enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila*. *Can J Microbiol* 39:513–523.

Chopra A.K., Graf J., Horneman A.J. and Johnson J.A. 2009. Virulence factor-activity relationships (VFAR) with specific emphasis on *Aeromonas* species. *Journal of Water and Health* 7:529–554.

El-Sayed A.F.M. 2006. *Tilapia Culture*. Oxfordshire: CABI Publishing 23:11-13.

Ellis A.E., Burrows A.S. and Stapleton K.J. 1998. Lack of relationship between virulence of *Aeromonas salmonicida* and the putative virulence factors, A-layer, extracellular proteases and extracellular haemolysins. *Journal of Fish Diseases* 11: 309–323.

Esteve C., Biosca E.G., and Amaro, C. 1993. Virulence of *Aeromonas hydrophila* and some other bacteria isolated from European eels *Anguilla Anguilla* reared in fresh water. *Diseases of aquatic Organisms* 16:15-20.

Esteve C., Amaro C. and Toranzo A.E. 1994. O-serogrouping and surface components of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei* pathogenic for eels. *FEMS Microbiol Lett* 117:85 -90.

Esteve C. 1995. Numerical taxonomy of *Aeromonadaceae* and *Vibrionaceae* associated with reared fish and surrounding fresh and brackish water. *Systematic and Applied Microbiology* 18:391–402.

Esteve C. and Birbeck T.H. 2004. Secretion of haemolysins and proteases by *Aeromonas hydrophila* EO63: separation and characterization of the serine protease (caseinase) and the metalloprotease (elastase). *J Appl Microbiol* 96:994–1001.

Esteve C., Alcaide E. and Blasco M.D. 2012. *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* isolated from feces, water and fish in Mediterranean Spain. *Microbes Environ* 27:367–373.

Farmer J.J., Arduino M.J. and Hickman-Brenner F.W. 2006. The general *Aeromonas* and *Plesiomonas*. *Prokaryotes* 6:564–596.

Figueras M.J. 2005. Clinical relevance of *Aeromonas*. *Rev Med Microbiol* 16:45–53.

Figueras M.J., Beaz-Hidalgo R. y Paredes K. 2011. Furunculosis y otras infecciones producidas por *Aeromonas*. *Enfermedades infecciosas del cultivo de Salmonidos en Chile y el Mundo*. *Niva Chile S.A.* 22:285–374.

Finlay B.B and Falkow S. 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol Biol Rev* 61:136-169.

García M.P., Fernandez M.T., y Paredes S.F. 1994. *Microbiología clínica práctica*. Repeto-Cadiz 266-268.

García J. A., Larsen J.L, Dalsgaard I. and Pedersen K. 2000. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Aeromonas salmonicida ssp. salmonicida*. *FEMS Microbiol. Lett.* 190:163–166.

García-Gasca T., Salazar Olivo L. A., Mendiola-Olaya E. and Blanco-Labra A. 2002. The effects of a protease inhibitor fraction from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) on in vitro cell proliferation and cell adhesion of transformed cells. *Toxicology In Vitro* 16:229-233

Genco C. A. and Dixon D. W. 2001. Emerging strategies in microbial haem capture. *Mol Microbiol* 39(1):1-11.

Gianella R. 1976. Suckling mouse model for detection of heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin: characteristics of the model. *Infect Immun.* 14(1):95-9.

Gianella R. 2009. Suckling mouse model for detection of heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin: characteristics of the model. *Infect Immun.* 14(1):95-9.

Gierer W., Rabsch W. and Reissbrodt R. 2006. Siderophore pattern of fish pathogenic *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas spp.* and *Pseudomonas spp.* from the German Baltic coast. *J. Fish Dis* 15:417-423.

Gómez-Gil B., Soto-Rodríguez S., Garcia-Gasca A., Roque A., Vazquez-Juarez R. and Thompson F. L. 2004. Molecular identification of *Vibrio harveyi* related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology* 150: 1769-1777.

Guerra M.F., Fadanelli R., Figueiró M., Schreiner F., Delamare A.P., Wollheim C., Costa S.P. and Echeverrigaray S. 2007. *Aeromonas* associated diarrhoeal disease in south Brazil: prevalence, virulence factors and antimicrobial resistance. *Braz J Microbiol* 38(4):638-643.

Hastein T., Saltveit S.J. and Roberts R.J. 1978. Mass mortality among minnows *Phoxinus phoxinus* (L.) in Lake Tveivatn, Norway due to an aberrant strain of *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Fish Diseases* 1:241–249.

Herrera M., Salas J.L., Guevara J.V. y Bonilla C. 1984. Diarrea por *Aeromonas hydrophila* Rev. Med. Hosp. Nal. 19 (1):29-34.

Howard S.P. and Buckley J.T. 1985. Activation of the hole forming toxin aerolysin by extracellular processing. *J Bacteriol* 163:336–340.

Hu M., N. Wang Z.H. Pan C.P. Lu and Lui Y.J. 2012. Identity and virulence properties of *Aeromonas* isolates from diseased fish, healthy controls and water environment in China. *Lett. Appl. Microbiol* 55: 224–233

Janda J.M., Guthertz L.S., and Kokka R.P. 1994. *Aeromonas* species in septicemia: laboratory characteristics and clinical observations. *Clin Infect Dis* 19: 77-83.

Janda J.M. 2001. *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In: *Molecular Medical Microbiology*, Academic Press, San Diego, CA. ed. by M. Sussman. 1237–1270 pp.

Janda J.M. and Abbott S.L. 2010. The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin Microbiol Rev* 23:35-73.

Jeney Z., Riicz T., Thompson K.D., Poobalane S., Ardo L., Adams A. and Jeney G. 2009. Differences in the antibody response and survival of genetically different varieties of common carp (*Cyprinus carpio* L.) vaccinated with a commercial *Aeromonas salmonicida*/ *A. hydrophila* vaccine and challenged with *A. hydrophila*. *Fish physiol Biochem* 35:677-682.

Joseph S.W. and Carnahan A. 1994. The isolation, identification and systematics of the motile *Aeromonas* species. *Annual Review of Fish Diseases* 4:315–343.

Kirkan Ş., Göksoy E.Ö. and Kaya O. 2003. Isolation and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas salmonicida* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey hatchery farms. *J Vet Med* 50(2): 339-342.

Kozaki S., Kato K. Kuroka W.A., Kamata Y. Asao T.Y and Sakaguchi, G. 1988. Production of monoclonal antibody against *Acromonas hydrophila* hemolysin. *J. Med. Microbiol.* 25:187-190.

Kregulak K.D. and Vogel H. J. 2008. Structural biology of bacterial iron uptake. *Bioch. Biophys. Acta.* 1778:1781-1804.

Labella K.V. and Gopakumar K. 2001. Sensivity of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to *Clostridium botulinum* toxins. *Aquacul. Res.* 32:761-764.

Lee S., Kim S. and Oh Y. 2000. Characterization of *Aeromonas hydrophila* isolated from rainbow trouts in Korea. *J Microbiol* 1:1-7.

Leszek G. and Alicja K. 2004. Antibiotic susceptibility of *Aeromonas hydrophila* and *sobria* isolated from farmed carp (*Cyprinus carpio* L.) *Bull Vet Inst Pulawy.* 48(2): 391-395.

Leung K.Y. and Stevenson R.M.W. 1988. Characteristics and distribution of extracellular proteases from *Aeromonas hydrophila* 1 *Gen. Microbiol.* 134:151-160.

Li Y., Liu Y., Zou Z., Huang H., Ren Y., Zhang Y., Li G., Zou Z. and Wang L. 2011. Complete genome sequence of *Aeromonas veronii* strain B565. *Journal of Bacteriology* 193:3389–3390.

Liu P.C., Chuang W.H., Tu C.C. and Lee K.K. 2010. Purification of a toxic cysteine protease produced by pathogenic *Aeromonas hydrophila* isolated from rainbow trout. *Journal of Bacteriology* 50:538–547.

Ljungh A., Wretlind B. and Mollby R. 1981. Separation and characterization of enterotoxin and two hemolysins from *Aeromonas hydrophila*. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B* 89:387–397.

Majumdar T., Datta S., Ghosh D., Dutta S., Chakraborty A., Goswami R. and Mazumder, S. 2007. Role of virulence plasmid of *Aeromonas hydrophila* in the pathogenesis of ulcerative disease syndrome in *Clarias batrachus*. *Indian J Biochem Biophys* 44:401-406.

Martin-Carnahan A. and Joseph S.W. 2005. Family I. Aeromonadaceae Colwell, MacDonell and DeLey 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2. 54-72.

Martinez-Murcia A.J., Esteve C., Garay E. and Collins M.D. 1992. *Aeromonas allosaccharophila* sp. nov., a new mesophilic member of the genus *Aeromonas*. *FEMS Microbiology Letters* 91:199–206.

Martínez-Murcia A., Morena A., Saavedra M.J., Ocina R., López-Álvarez M., Lara E. and Figueras M.J. 2011. Multilocus phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas*. *Syst. Appl. Microbiol.* 34:189–199.

Massad G., Arceneaux J. and Byers B. 1991. Acquisition of iron from host sources by mesophilic *Aeromonas* species. *J Gen Microbiol* 137:237-241.

Massad G., Arceneaux J. and Byers B. 1994. Diversity of siderophore genes encoding biosynthesis of 2,3-dihydroxybenzoic acid in *Aeromonas* spp. *Biometals* 7:227-236.

Matsuo Y. 2011. Streptobactin, a Triccatechol-Type Siderophore from Marine-Derived *Streptomyces* sp. YM5-799. *Journal of Natural Products* 74: 2371-2376.

Merino S., Gavin R., Vilches S., Shaw J.G. and Toma's J.M. 2003. A colonization factor (production of lateral flagella) of mesophilic *Aeromonas* spp. is inactive in *Aeromonas salmonicida* strains.

Meyer, G. 1999. Role of salicylic acid in systemic resistance to disease induced by the root -colonizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. PhD Thesis. Gent University.

Morinaga Y., Yanagihara K., Latif F.L., Beaz-Hidalgo R., Kohno S. and Figueras M.J. 2013. Identification error of *Aeromonas aquariorum*: A causative agent of septicemia. *Diagnostic Microbiology and infectious Disease. USA.*

Neilands J.B. 1995. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem* 160:47-56.

Nieto T.P. and Ellis A.E. 1986. Characterization of extracellular metallo- and serine-proteases of *Aeromonas hydrophila* strain B51. *Gen. Microbiol.* 132:1975-1979.

Noga E.J. 2010. Fish Diseases: Diagnosis and Treatment. *Applied and Environmental Microbiology* 2:152-155.

Noonin C., Jiravanichpaisal P., Soöderhall I., Merino S., Tomas J.M. and Sooderhall K. 2010. Melanization and pathogenicity in the insect, *Tenebrio molitor*, and the crustacean, *Pacifastacus leniusculus*, by *Aeromonas hydrophila*. *Applied and Environmental Microbiology* 3(2):663–667.

Pansare A.C. and Lewis N.F., Venugopal V. 1986. Characterization of extracellular proteases of *Aeromonas hydrophila*. *Agric Biol Chem* 50:1743–1749.

Paperna I. 1996. Parasites, infections and diseases of fishes in Africa. FAO 31: 220.

Parreira V., Weis C. and Yano T. 2010. An agar-overlay method for detection of toxins produced by *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett 120: 303 -306.

Pridgeon J.W. and Klesius P.H. 2011. Virulence of *Aeromonas hydrophila* to channel catfish *Ictalurus punctatus* fingerlings in the presence and absence of bacterial extracellular products. Dis Aquat Org 95: 205-215.

Rahman M., Colque-Navarro P., Kuhn I., Huys G., Swings J. y Mollby R. 2002. Identification and characterization of pathogenic *Aeromonas veronii* biovar *sobria* associated with epizootic ulcerative syndrome in fish in Bangladesh. Applied and Environmental Microbiology 68:650–655.

Rey A., Verjiin N., Ferguson H.W., and Iregui C. 2009. Pathogenesis of *Aeromonas hydrophila* strain KJgb infection and its extracellular products in two species of fish. Vet Rec 164: 493-499

Rivero O., Anguita J., Mateos D., Paniagua C. and Naharro G. 1991. Cloning and characterization of an extracellular temperature-labile serine protease gene from *Aeromonas hydrophila*. FEMS Microbiol. Lett. 81:1-8.

Sakai D.K. 1985. Loss of virulence in a protease-deficient mutant of *Aeromonas salmonicida*. Infect. Immun. 48:146-152.

Salgado-Miranda C., Palomares E., Jurado M., Marín A., Vega F. and Soriano-Vargas E. 2010. Isolation and distribution of bacterial flora in farmed rainbow trout from Mexico. J. Aquat. Anim. Health 22:244–247.

Salyers A.A. and Whitt D.D. 1994. Bacterial pathogenesis. A molecular approach. Department of Microbiology, University of Illinois, USA.

Santos Y., Toranzo A.E., Barja J.L., Nieto T.P. and Villa T.G. 1998. Virulence properties and enterotoxin production of *Aeromonas* strains isolated from fish. Infect Immun 56:3258–3293.

Santos J.A., Gonzalez C.J. and Otero A. 1999. Hemolytic activity and siderophore production in different *Aeromonas* species isolated from fish. Appl Environ Microb 65: 5612-5614.

Sirirat T., Intuseth J., Chanphong J., Thompson K., Chinabut S. and Adams A. 1999. Characterization of *Aeromonas hydrophila* extracellular products with reference to toxicity, virulence, protein profiles and antigenicity. Asian Fish Sci 12:371–379.

Soto-Rodriguez S.A., Cabanillas-Ramos J., Alcaraz U., Gomez-Gil B. and Romalde J.L. 2013. Identification and virulence of *Aeromonas dhakensis*, *Pseudomonas mosselii* and *Microbacterium paraoxydans* isolated from Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, cultivated in Mexico. *Journal of Applied Microbiology* 115: 654—662.

Soto-Rodriguez S.A. 2002. Estudio de los mecanismos de patogenicidad de bacterias luminiscentes en larvas de camaron. Tesis doctoral. Centro de investigación científica y de educación superior de Ensenada. Ensenada, Baja California.

Stintzi A., and K. Raymond. 2000. Amonabactin-mediated iron acquisition from transferrin and lactoferrin by *Aeromonas hydrophila*: direct measurement of individual microscopic rate constants. *J Biol Inorg Chem* 5:57-66.

Suarez W. y Herrera A. 2012. Determinación de factores de virulencia en cepas de *Aeromonas spp*, aisladas a partir de pescado. *Rev. MVZ Córdoba* 17(1): 2846-2851.

Suat-Moi P., Puthuchearyb S.D., Fong-Yin L. and Kek-Heng C. 2013. *Aeromonas aquariorum* clinical isolates: antimicrobial profiles, plasmids and genetic determinants. *International Journal of Antimicrobial Agents* 41 (2013): 281– 284.

Subashkumar R., Theyumanavan T., Vivekanandhan G. and Perumalsamy L. 2006. Multiple antibiotic resistant, haemolytic and proteolytic activity of *Aeromonas hydrophila* isolated from acute gastroenteritis in children. *Indian J Med Res* 23:61–66.

Todar K. 2009. Mechanisms of bacterial pathogenicity. (citado 6 de octubre de 2010) [www.textbookofbacteriology.net](http://www.textbookofbacteriology.net).

Toranzo A.E., Baya A.M., Romalde J.L. and Hetrick F.M. 1989. Association of *Aeromonas sobria* with mortalities of adult gizzard shad, *Dorosoma cepedianum* Lesueur. *Journal of Fish Diseases* 12:439–448.

Toranzo A.E. and Barja J.L. 2000. Virulence factors of bacteria pathogenic for coldwater fish. *Annual Review of fish diseases*. 3: 5-36.

Ullal A.J., Litaker R.W. and Noga E.J. 2008. Antimicrobial peptides derived from hemoglobin are expressed in epithelium of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Dev Comp Immunol* 32:1301-1312.

Vega-Sánchez V., Acosta-Dibarrata J., Vega-Castillo F., Castro-Escarpulli G., Aguilera-Arreola G. and Soriano-Vargas E. 2014. Phenotypical

characteristics, genetic identification, and antimicrobial sensitivity of *Aeromonas* species isolated from farmed rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) in Mexico. *Acta tropica* 130:76-79.

Versalovic J., Schneider M., De Bruijn F.J. and Lupski J.R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Cell Biology* 5:25-40.

Von G.A. 2007. The role of *Aeromonas* in diarrhea: a review. *Infection* 35(2):59-64.

Wihelms M., Vilches S., Reyes M., Moler R., Shaw J.G., Toma's J.M. and Merino S. 2009. Two redundant sodium-driven stator motor proteins are involved in *Aeromonas hydrophila* polar flagellum rotation. *Journal of Bacteriology* 191:2206–2217.

Yin G., Ardó L., Thompson K.D., Adams A., Jeney Z. and Jeney G. 2009. Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Ganoderma lucidum*) enhance immune response of carp, *Cyprinus carpio*, and protection against *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol* 26:140-145.

Yu H.B., Zhang Y.L., Lau Y.L., Yao F., Vilches S., Merino S., Toma's J.M., Howard S.P. and Leung K.Y. 2005. Identification and characterization of putative virulence genes and gene clusters in *Aeromonas hydrophila* PPD134/91. *Applied and Environmental Microbiology* 71:4469–4477.

Zhang X.H. and Austin B. 2000. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. *Journal of Fish Diseases*, 23:93-102.

Zywno S.R., Arceneaux J.E.L. and Altwegg M. 1992. Siderophore production and DNA hybridization groups of *Aeromonas* spp. *J Clin Microbiol* 30: 619-622.