



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLIARIO DE CIENCIAS MARINAS



CIENCIAS MARINAS
BIBLIOTECA
I. P. N.
DONATIVO

DEPARTAMENTO DE DESARROLLO DE TECNOLOGIAS

**ESTUDIO DE UNA ENFERMEDAD HEMORRAGICO ULCERATIVA
EN UN LOTE DE REPRODUCTORES DE CABRILLA ARENERA**
Paralabrax maculatofasciatus (Steindachner, 1868) : Osteichthyes;
Serranidae

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

B.M. SERGIO FRANCISCO MARTINEZ DIAZ

LA PAZ B.C.S. 1995

ÍNDICE

Indice	I
Lista de tablas	II
Lista de figuras	II
Glosario	III
Abreviaturas	IV
Resumen	VI
Abstract	VII
1. Introducción	1
1.1. Microflora bacteriana de los peces	2
1.2. Agentes bacterianos infecciosos	4
1.3. Factores que propician enfermedades en los peces	5
2. Antecedentes	7
3. Justificación	13
4. Objetivos	16
5. Posición taxonómica y distribución geográfica de <i>P maculatofasciatus</i>	17
6. Materiales y Métodos	18
6.1. Descripción del sistema recirculatorio de inducción al desove	18
6.2. Caracterización de los síntomas de peces enfermos	23
6.3. Aislamiento e identificación de bacterias relacionadas	23
6.4. Determinación de la patogenicidad de las bacterias aisladas	25
6.4.1. Colecta y Aclimatación de los organismos experimentales	25
6.4.2. Inducción experimental de la infección	27
6.5. Comparación de parámetros sanguíneos	29
7. Resultados	31
7.1. Calidad del agua	31
7.2. Síntomas desarrollados en peces enfermos	31
7.3. Aislamiento de bacterias	32
7.4. Identificación de las bacterias aisladas	33
7.5. Pruebas de patogenicidad	38
7.6. Comparación de leucocitos	40
8. Discusión	44
9. Conclusiones	59
10. Recomendaciones	61
II. Literatura citada	64

Apéndice 1 Composición de los Medios de cultivo y pruebas bioquímicas.....	77
Apéndice 2 Parámetros físicos y químicos del SRID y cálculos estadísticos.....	88

Lista de tablas

Tabla 1.- Datos cuantitativos de la microflora de los peces..	.
Tabla 2.- Bacterias con capacidad de producir septicemias en peces ..	.
Tabla 3.- Régimen de mantenimiento del SRID..	21
Tabla 4.- Cepas aisladas para cada fuente y por cada medio empleado.	32
Tabla 5.- Fuente y Medio de cultivo de las cepas a identificar..	33
Tabla 6.- Caracterización Bioquímica de las cepas..	34
Tabla 7a.- Resultados de la identificación con API-NFT..	35
Tabla 7b.- Identificación de las cepas..	36
Tabla 8.- Distribución de las bacterias en órganos de peces enfermos..	37
Tabla 9a.- Ensayo de patogenicidad de la cepa 7 <i>Vibrio alginolyticus</i> .-	38
Tabla 9b.- Ensayo de patogenicidad de las cepas 1,7, 10, 12 y 13 ..	39
Tabla 9c.- Ensayo de patogenicidad con <i>Vibrio alginolyticus</i> ..	39
Tabla 10.- Conteo diferencial de leucocitos en peces sanos y enfermos..	40
Tabla 11.- Parámetros físicos y químicos en el SRID..	86
Tabla 12.- Sensibilidad a los antibióticos..	87

Lista de figuras

Figura 1- Esquema del Sistema Recirculatorio de Inducción al Desove.....	22
Figura 2.- Zonas de colecta de los organismos experimentales..	26
Figura 3.- Síntomas presentes en los peces enfermos..	41
Figura 4.- Leucocitos encontrados en la sangre de cabrilla ..	43
Figura 5.- Proceso infeccioso de <i>Vibrio alginolyticus</i>	56
Figura 6.- Parámetros físicos y químicos registrados en el SRID..	85

GLOSARIO

Anorexia.- Ausencia patológica del apetito.

Bacteremia.- Presencia de bacterias en el torrente sanguíneo.

Baño prolongado.- Tratamiento en una solución química a bajas concentraciones durante un tiempo superior a las 12 horas. Se aplica en tanques de cría intensiva, donde el recambio de agua es mínimo.

Baño.- Administración de un tratamiento terapéutico o profiláctico, disolviendo una sustancia en el agua que rodea al organismo. Se utilizan bajas concentraciones del medicamento por tiempos de 30 a 60 minutos.

Epizootia.- Enfermedad que ataca a una gran cantidad de animales de la misma especie al mismo tiempo en las áreas de contagio.

Hiperhemia.- Incremento de sangre en un tejido, como resultado de la distensión de los vasos sanguíneos. Congestión sanguínea.

Hiperplasia.- Desarrollo patológico de los tejidos

Infeción.- Alteración patológica de las funciones fisiológicas, ocasionada por la invasión de microorganismos en los tejidos.

Infestación.- Presencia de parásitos en el organismo.

Inflamación.- Reacción de los tejidos a daños caracterizados clínicamente por tumefacción, enrojecimiento y dolor. Se manifiesta por vasodilatación hiperhemia, acumulación de leucocitos, exudación de fluido y depositación de fibrina.

Linfocitopenia.- Bajos niveles de linfocitos en la sangre.

Petequia.- Pequeñas manchas redondas, hemorrágicas **sobre una** superficie, usualmente menores a un mm de diámetro.

Septicemia.- Síndrome clínico caracterizado por una intensa infección en la sangre.

Sistémico.- Concerniente al cuerpo en su totalidad. En una enfermedad sistémica, el agente infeccioso se encuentra en todo el cuerpo.

Stress.- Es la suma de todas las respuestas fisiológicas que ocurren cuando los animales intentan mantener o restablecer el metabolismo normal haciendo frente a cambios físicos o químicos.

Úlcera.- Rotura en la piel o membrana mucosa con pérdida del tejido superficial, desintegración y necrosis del tejido epitelial.

Virulencia.- Capacidad relativa de un patógeno para producir enfermedad.

Zoonosis.- Enfermedad de los animales que puede ser transmitida al hombre secundariamente.

ABREVIATURAS.-

B.C.S.	Baja California Sur	<i>In</i>	Contenido en
Bac	Bacterias	et al.	(et aliae) y otros
DA	Dulce acuicola	item	Del mismo modo
IPN	Instituto Politecnico Nacional	sp	Especie
CICIMAR	Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas	spp	Especies
I	Insensible	e.g.	por ejemplo
R	Resistente		
S	Sensible		

Unidades de medición

g	Gramos	%	Porciento
mg	Miligramos	0/00	Partes por mil
m	Metros	ppm	Partes por millon
cm	Centímetros	°C	Grados centigrados
µm	Micras	HP	Caballos de poder
l	Litros	% id	Confiabilidad de la identificación en %
ml	Mililitros		

Medios de cultivo y pruebas bioquímicas

TSA	Agar de Soya Triptocaseina	TSI	Agar hierro triple azucar
TCBS	Agar de sales de tiosulfato y bilis	KIA	Agar de Kligler
EMB	Agar eosina-azul de metileno lactosa- sac	OF	Oxidación Fermentación de Sacarosa
RM	Rojo de metilo	VP	Vogues-Proskauers
CIT	Citrato		

RESUMEN.-

Se realizó el estudio de una enfermedad infecciosa de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* ocurrida en un lote de reproductores en junio-julio de 1992 en un sistema recirculatorio de inducción al desove, en el Laboratorio de Biología Experimental del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas- IPN.

Se realizó el aislamiento e identificación de las bacterias asociadas a úlceras y órganos internos de peces enfermos.

Se evaluó el porcentaje diferencial de leucocitos en peces sanos y enfermos y la capacidad de las bacterias aisladas para producir una infección en peces sanos.

Los síntomas presentes en peces enfermos son hemorragias y petequia en la superficie corporal especialmente la base de las aletas pélvicas y región opercular, en aletas se observan hemorragias y necrosis. Se observa anorexia e inactividad, internamente se observan hemorragias en intestinos y el hígado descolorido, el intestino se observa distendido y lleno de una sustancia transparente.

De peces infectados, *Vibrio alginolyticus* fue aislada de úlceras, hígado, riñón y sangre, *Acinefobacter sp.* y *Pseudomonas pseudoalcaligens* de hígado, *Vibrio vulnificus* de úlceras y branquias y *Vibrio sp.* de úlceras.

En peces moribundos se observa disminución en el porcentaje de trombocitos, linfocitos y granulocitos y aumento en monocitos y macrófagos.

Con las cepas *Acinefobacter sp.*, *Pseudomonas pseudoalcaligens*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio sp.*, no se desarrollaron síntomas clínicos cuando se inyectaron vía intraperitoneal e intramuscular en dosis de 5×10^6 bacterias.

Con *Vibrio alginolyticus* en solo un ensayo se presentaron síntomas clínicos y mortalidad, sin presentarse como bacteremia, sin embargo al inyectarse en dosis de 1.05×10^8 bacterias vía intraperitoneal, no fue posible reproducir la infección. Se sugiere que el brote de enfermedad registrado en el lote de reproductores se produjo fundamentalmente por factores de stress.

ABSTRACT

Acute disease of the spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* was studied. The infectious disease occurred in broodstock in June and July of 1992 in a recirculating water system, used to induce spawning, at the Laboratory of Experimental Biology of the Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-IPN.

The bacterium, associated with skin lesions and liver and kidney failure was isolated.

The differential percentage of leukocytes in healthy and diseased fish was evaluated. The capacity of the isolates to produce an infection in healthy fish was tested.

Clinical signs of the disease include hemorrhages and petechia on body surfaces, specifically at the base of the pelvic fins and opercular region. Hemorrhages and necrosis were observed on the fins. Affected fish become inactive and anorexic. Internal hemorrhages in intestine and a pale liver were observed. The intestine is distended and full of a clear fluid.

From the affected fish, *Vibrio Alginolyticus* was isolated from ulcers, liver, kidney and blood; *Acinefobacter sp.* and *Pseudomonas pseudoalcaligens* from the liver; *Vibrio vulnificus* from ulcers and gills; and *Vibrio sp.* from ulcers.

In moribund fish, thrombocyte, lymphocyte and granulocyte percentages are lower than in healthy fish, whereas monocyte and macrophage percentage is higher.

Only *V. alginolyticus* developed clinical signs and mortality but no bacteremia was detected. However, when fish were intraperitoneally injected with up to 1.05×10^8 bacteria, septicemia did not develop. These results seem to suggest that septicemic condition shown by broodstock fish was mainly due to stress factors.

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, la producción pesquera mundial por acuicultura ha mostrado un gran desarrollo en comparación con la explotación de organismos silvestres con propósitos alimenticios y de esparcimiento (Håstein & Línstad, 1991). Uno de los factores que ha determinado este crecimiento, es la incorporación de un número cada vez mayor de especies cuyas características las han hecho factibles de ser cultivadas.

La incorporación de nuevas especies al cultivo, va seguida de riesgos potenciales, como el surgimiento de nuevas enfermedades o la aparición de cepas patógenas, resistentes a los métodos empleados tradicionalmente para su control y erradicación (Sindermann, 1990).

Como consecuencia de las altas densidades a la que son manejados los peces durante el cultivo, se observa un aumento en la frecuencia y velocidad de propagación de enfermedades infecciosas (Håstein & Lindstad, 1991); el surgimiento de epizootias, es un proceso densodependiente que se encuentra relacionado con un incremento en la capacidad de los patógenos para producir una infección en peces sometidos a condiciones ambientales adversas, así como a una mayor eficiencia de transmisión (Sindermann, 1990).

Debido a las condiciones que se dan con la intensificación de los cultivos (como el incremento en la densidad de cultivo); el stress al que son sometidos los organismos aumenta y con el auge que en años recientes han tenido los cultivos intensivos, se ha dado un aumento en la incidencia y severidad de las enfermedades, así como el surgimiento de nuevas condiciones infecciosas (Frerichs, 1984).

Las bacterias patógenas son los agentes productores de enfermedades más importantes del ambiente acuático (Shotts & Bullock, 1975), muchas de las cuales son facultativas y causan enfermedades cuando los organismos son sometidos a "stress"

ambiental (Mqolomba & Plumb, 1992).

Las enfermedades causadas por bacterias, han sido un factor limitante de la factibilidad del cultivo de algunas especies de peces (Colorni et al., 1981). Particularmente los padecimientos causados por bacterias Gram-negativas son la causa principal de las mortalidades en sistemas de piscicultura intensivo (Biosca et al., 1991). Los síntomas y la resistencia mostrada por especies distintas para una misma enfermedad puede ser diferente, por lo que el impacto sobre el cultivo no siempre es el mismo (Sindermann, 1990).

Algunas enfermedades que se presentan en el piscicultura, son un problema grave, no solo por las pérdidas económicas atribuibles a ellas, sino por el efecto adverso que las granjas pueden ejercer sobre las poblaciones silvestres con la descarga de agua con altos contenidos bacterianos, residuos de medicamentos o por la liberación de peces enfermos (a pesar de que se tiene conocimiento de la presencia de muchas enfermedades infecciosas en dichas poblaciones) (Austin & Austin, 1987)

1.1 Microflora bacteriana normal de los peces

Por las características del medio en que se desarrollan, los peces marinos son bañados continuamente por una suspensión acuosa de microorganismos, los que pueden colonizar las superficies y pasar a formar parte de la microflora residente del pez (Austin & Austin, 1987).

La microflora en peces, es reflejo del número y los taxa presentes en el ambiente (Austin, 1982,1983; Allen et al., 1983; Nieto et al., 1984). La cantidad de bacterias que conforman la microflora de los peces ha sido estudiada por diversos autores y de manera general, existe una mayor densidad en el tracto digestivo que en las superficies expuestas al ambiente -hasta cien millones de bacterias por gramo de tracto intestinal (Tabla 1)- (Yoshimizu et *al.*, 1976).

Tabla 1.- Datos cuantitativos de la microflora de los peces.

Especie	Cantidad	Fuente	Autor
<i>Salmo salar</i>	1 00-1 000 Bac/cm ²	Piel	Horslev. 1973
<i>Mugil cephalus</i>	4000-80000 Bact/cm ²	Piel	Gillespie & Macrae, 1975
<i>Sillago ciliato</i>	4000-80000 Bact/cm ²	Piel	Gillespie & Macrae, 1975
<i>Platycephalus fiscus</i>	4000-80000 Bact/cm ²	Piel	Gillespie & Macrae 1975
<i>Salmonidos</i>	1x10 ⁶ Bact/g	Branquias	Trust, 1975
<i>Salmonidos</i>	1x10 ⁸ Bac/g	Tracto intestinal	Trust & Sparrow, 1974
<i>Salmonidos</i>	1x10 ⁸ Bac/g	Tracto intestinal	Yoshimizu et al., 1976
<i>Seriola spp.</i>	20000 Bac/g	Ciegospilóricos	Sakata et al., 1978
<i>Seriola spp.</i>	250000 Bac/g	Estomago	Sakata et al., 1978
<i>Seriola spp.</i>	65000-5900000 Bac/g	Intestino	Sakata et al., 1978
<i>Seriola spp.</i>	710000 Bac/g	Intestino	Sakata et al., 1978
<i>Salmonidos</i>	1000-1 000000 Bac/g	Huevos	Yoshimizu et al., 1980

La composición y el número de microorganismos que conforman la microflora de los peces, son afectados por la densidad de microorganismos en el ambiente, cambios en los parámetros físicos y químicos, la nutrición y el proceso de envejecimiento, durante el cual, los cambios en el mucus y otras secreciones determinan las poblaciones microbianas de varias membranas. Existen además cambios asociados con la producción de hormonas, lo cual indirectamente afecta la microflora bacteriana de órganos como los del tracto reproductor de las hembras. Las condiciones a las que son sometidos los peces experimentales, como la irradiación masiva de rayos X o exposición a sustancias químicas, inducen cambios marcados en la microflora y disminuyen la resistencia a la invasión bacteriana (Carpenter, 1977).

La composición de la microflora bacteriana dentro de las granjas de peces marinos es típica del ambiente marino, donde los bacilos Gram-negativos son dominantes del sistema (Siebert, 1979; Pelczar et al., 1982)

Las poblaciones microbianas del ambiente presentan fluctuaciones, debidas a cambios estacionales y casuales en las condiciones físicas, químicas y en la

disponibilidad de nutrientes. En las granjas de peces marinos, se presentan fluctuaciones estacionales en el número de bacterias heterótrofas aerobias, con mínimos en invierno y máximos en verano, las cuentas más altas son obtenidas consistentemente en los efluentes, con poblaciones bacterianas entre 5 y 50 veces mayores que en el agua entrante al sistema (Austin, 1982). Esta variación cuantitativa, de manera general, es el reflejo de las fluctuaciones estacionales debidas a cambios en la temperatura del agua. El número de bacterias que se desarrollan en los tanques de cultivo, se mantiene más alto que en el agua entrante, ello se explica como una respuesta de los microorganismos a las condiciones favorables, como el aumento en la disponibilidad de nutrientes (Austin & Austin, 1987).

En algunos casos, los microorganismos comunes en el agua o en la microflora normal del pez se pueden desarrollar como patógenos oportunistas, causando enfermedades a peces, invertebrados y en casos extremos a humanos, ello favorecido por las altas densidades bacterianas en el agua (Austin & Austin, 1987).

1.2 **Agentes bacterianos infecciosos**

Muchos géneros bacterianos han sido reportados como patógenos de peces, tanto en organismos de agua dulce como en marinos. En el mundo, se han aislado aproximadamente 35 especies bacterianas asociadas con enfermedades de peces. De las cuales, 12 son consideradas los principales patógenos de peces, y solamente 5 como patógenos obligados. Del total, 9 han sido asociadas con enfermedades en humanos (Sanders & Fryer, 1988 *in*: Austin, 1988).

Conroy (1984) (*In*: Sindermann, 1990), describe un esquema en el que agrupa las principales bacterias marinas patógenas de peces, el cual comprende:

- 1.- Organismos Gram-negativos (*Vibrio*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* y *Pasteurella*), causantes de septicemias hemorrágicas.

- 2.- Bacterias Ácido resistentes (*Micobacterium*, *Nocardia*), causantes de

tuberculosis y nocardiosis.

3.- Patógenos Gram-positivos (***Sf*reptococcus sp. y *Renibacterium salmoninarum***), causantes de enfermedades focales o sistémicas y mortalidad.

4.- Bacterias anaeróbicas (***Eubacterium***) **el** cual causa infecciones sistémicas y mortalidad.

5.- Mixobacteria (***Flexibacter***) causante de la patología branquial y de las aletas, además de la erosión de piel y cartílago.

1.3 **Factores que propician enfermedades en los peces**

La presencia del agente infeccioso no necesariamente trae como consecuencia una condición patológica, sino que el desarrollo de una enfermedad puede resultar de un complejo de interacciones entre el portador, el ambiente y el agente infeccioso relacionado (Worren, 1983; Austin & Austin, 1987).

Es necesario enfatizar que el ambiente donde se desarrollan los peces, usualmente contiene una variada microflora que incluye bacterias, virus y parásitos capaces de generar enfermedades graves, tanto en granjas como en poblaciones silvestres (Håstein & Lindstad, 1991); y que gran parte, si no es que todos los microorganismos de la flora normal de un individuo, pueden causar una enfermedad bajo circunstancias apropiadas (Austin & Austin, 1987).

La probabilidad de que resulte una enfermedad de la exposición a un patógeno, es directamente proporcional al número de microorganismos y a su virulencia, pero inversamente proporcional a la resistencia del portador como establece la relación de Theobald Smith, (Carpenter, 1977).

En la interacción portador-patógeno, el principio de la enfermedad representa la disminución de las defensas del portador (por un estado fisiológico adverso), como puede ocurrir durante el período reproductivo o como resultado del “stress” ambiental y el incremento en el número y/o virulencia del patógeno (Sindermann, 1990).

En el Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, se explora la factibilidad del cultivo comercial de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. Durante las operaciones de mantenimiento de esta especie se ha registrado la presencia de bacterias y parásitos, que en muchos de los casos provocan la muerte de parte de los lotes, así como el retraso en la obtención de resultados experimentales.

En el presente trabajo se buscó determinar las causas de la enfermedad hemorrágica que se desarrolló en una población de reproductores de la cabrilla arenera. Para lo cual se propuso la siguiente hipótesis de trabajo:

Las bacterias presentes en las lesiones de cabrillas enfermas pueden ser la causa de la condición hemorrágica desarrollada en el lote de reproductores así como de su muerte.

2. ANTECEDENTES

Los peces son susceptibles a infecciones bacterianas, las que bajo ciertas condiciones se manifiestan como brotes de enfermedad y son detectados como padecimientos agudos (septicemias), crónicos (granulomatosis) o subclínicos (infecciones asintomáticas) (Frerichs, 1984).

Las septicemias hemorrágicas bacterianas en peces son un grupo de padecimientos infecciosos de tipo sistémico y de carácter ulcerativo (Sindermann, 1990).

El desarrollo de septicemias en peces ha sido atribuida a diferentes bacterias. El número de géneros considerados con capacidad de generar una septicemia, varían dependiendo del autor: Frerichs (1984) menciona que existen 7 géneros de bacterias Gram(-) y 1 Gram(+) capaces de producir septicemias (Tabla 2). Por su parte Sindermann (1990) considera que los agentes etiológicos en epizootias en peces marinos son bacterias heterótrofas, Gram(-), de los géneros Vibrio, Pseudomonas, Aeromonas y Pasteurella.

**Tabla 2.- Bacterias con capacidad de producir septicemias en peces
 (Frerichs, 1984)**

Familia (Gram)	Genero	Especie	Ambiente
Enterobacteriaceae (-)	Edwardsiella	<i>E. ictaluri</i>	Da
	Yersinia	<i>Y. ruckeri</i>	Da
Pseudomonaceae (-)	Pseudomonas	<i>P. fluorescens</i> <i>P. anguilliseptica</i>	Da,M M
	Alteromonas	<i>A. piscicida</i>	M
Vibrionaceae (-)	Vibrio	<i>V. anguillarum</i>	Da,M
		<i>V. ordalii</i>	M
		<i>V. vulnificus</i>	M
Incierta (-)	Flavobacterium	<i>F. spp</i>	Da,M
	Pasteurella	<i>P. piscicida</i>	Da,M
Streptococcaceae (+)	Streptococcus	<i>S. faecalis</i>	Da,M
		<i>S. spp</i>	

Ambientes: Da= Dulceacuicola; M= Marino.

De los géneros listados el que se ha encontrado mayormente relacionado con las septicemias es *Vibrio*, el cual es de ocurrencia universal en ambientes marino-estuarinos y puede ser facultativamente patógeno para muchas especies de peces e invertebrados (Colwell, 1984).

La vibriosis es probablemente la enfermedad más severa de los cultivos marinos, por las grandes pérdidas económicas que ha propiciado (Sindermann, 1990)

Las especies que han sido implicadas en patologías producidas por *Vibrio* (vibriosis) son:

1) *Vibrio anguillarum* considerado el principal agente etiológico de la vibriosis, presenta facultades de colonizar e invadir los tejidos del portador en los que sobrevive y prolifera (Baudin-Laurencin, 1987),

2) *Vibrio ordalii* recientemente propuesta como nueva especie del designado

biotipo II de *V. anguillarum* (Schiewe et al., 1981),

3) *Vibrio cholerae* aislada en Japón de *Plecoglossus altivelis*,

4) *Vibrio vulnificus* aislada de *Anguilla japonica* (Muroga et al., 1976 a,b),

5) *Vibrio damsela* aislada de *Chromis punctipinnis* en Estados Unidos

6) *Vibrio alginolyticus* que a pesar de haber sido aislada de peces enfermos de las especie *Sparus aurata* en el Mar Rojo (Colorni et al., 1981) y de *Acanthopagrus schlegeli* (Kusuda et al., 1986); su papel dentro de las infecciones no es aún bien comprendido (Austin & Austin, 1987).

Estas especies han propiciado pérdidas cuantiosas en las granjas piscícolas de muchas partes del mundo (Cisar & Fryer 1969; Anderson & Conroy 1970; Fryer *et al.*, 1972). La patología asociada con la vibriosis la han descrito numerosos autores, encontrándose diferencias en los síntomas manifestados por especies distintas de peces, estas incluyen: la extensión de las hemorragias internas y la distribución de las células bacterianas en los tejidos del portador (Harbell 1976; Funahashi *et al.*, 1974; Miyazaki & Kubota 1977; Miyazaki *et al.*, 1977); explicándose en base a la respuesta de cada portador y/o por la virulencia de la bacteria causante de la enfermedad (Ransom *et al.*, 1984).

De acuerdo con Hofer (1904) (*In*: Sindermann, 1990), la septicemia producida por *V. anguillarum*, es conocida en las costas italianas desde 1718, a partir de entonces, se han registrado numerosas epizootias ocasionadas por esta especie. Los signos de infección incluyen enrojecimiento progresivo de las aletas y piel, hemorragias viscerales, reducción de la actividad y la muerte precedida por el desgaste y pérdida de la piel (Anderson & Conroy, 1970; Sindermann,1990). De acuerdo con Austin & Austin (1987) la enfermedad causada por esta especie, ocurre en mas de 14 países, donde causa estragos en aproximadamente 48 especies de

peces marinos. Inicialmente pareció confinada a aguas europeas, sin embargo, en 1953 fue reportada en Norteamérica (Crosa et al., 1977) y en Japón en 1975, pudiendo ser la causa la importación de anguilas contaminadas procedentes de Francia (Muroga et al., 1976a,b). Existe evidencia de que esta enfermedad ocurre también en agua dulce (Muroga, 1975; Ghittino & Andruetto, 1977), lo que sugiere que es un problema ampliamente propagado.

A pesar de que en muchas de las epizootias en peces cultivados se ha podido determinar que el agente etiológico es el mismo, se observan diferencias en los síntomas producidas para las distintas especies así como en diferentes regiones geográficas (Burke & Rodgers, 1981 ;Rodgers & Burke, 1988; Horne et al., 1977).

Bruun y Heibergh en 1935 (In: Sindermann, 1990) sugirieron que un gran número de bacterias patógenas podían estar relacionadas con las septicemias para las distintas regiones geográficas del mundo. En Dinamarca, la presencia de diferencias en los síntomas registrados durante el período de enfermedad, que van desde la extensión de las úlceras y su penetración en tejido muscular, así como el grado de virulencia de las cepas aisladas; sugirió en un principio la posibilidad de infecciones mixtas o la presencia de una nueva enfermedad. Investigaciones posteriores indicaron la presencia de dos enfermedades de sintomatología parecida: la primera producida por *Vibrio anguillarum* preponderante en verano, y la segunda, dominante en primavera, en la que se relacionan *Aeromonas*, *Alcaligenes* y *Vibrio* (Hansen & Bonde, 1973; Jensen et al., 1983).

Entre las especies de patógenos facultativos que han sido implicados en las septicemias hemorrágicas bacterianas de peces marinos se encuentran: **a)** *Pseudomonas anguilliseptica* en cultivos de anguilas en Japón (Muroga et al., 1973,

1975, 1977a,b; Muroga et al., 1987; Miyazaki & Egusa, 1977); b) *Pseudomonas (Aeromonas) punctata* en anguilas de agua dulce (Schaperclaus, 1930); c) *Aeromonas hydrophila* en *Trachinotus carolinus* y *Morone saxatilis* (Hawke, 1976); y d) *Pasteurella piscicida* en *Morone americana* (Snieszko et al., 1964 a,b) y *Morone saxatilis* (Hawke et al., 1987).

La taxonomía de los patógenos responsables de las septicemias de peces - *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* etc.- se encuentra en un estado dinámico (Sindermann, 1990), como ejemplo se tiene que muchas nuevas especies de *Vibrio* han sido propuestas en la última década, incluyendo *Vibrio fluvialis* el cual abarca cepas de aeromonas y vibrios (Lee et al., 1981) y *V. ordalii* formalmente biotipo II de *V. anguillarum*. (Schiewe et al., 1981).

En algunos casos, la patogenicidad de las bacterias aisladas de las infecciones de los peces ha sido probada; sin embargo, en otros es dudoso el papel que pueden tener dentro del proceso infeccioso (Austin & Austin, 1987), Por ejemplo *Vibrio alginolyticus* (antes considerada biotipo de *Vibrio parahaemolyticus*), ha sido aislada en casos de vibriosis de peces e invertebrados marinos y su significado en la patología de peces es dudoso, por lo que algunos autores coinciden en la necesidad de probar su capacidad para propiciar efectos patológicos (Colorni et al., 1981; Akazawa 1968; Burke & Rodgers 1981; Austin & Austin 1987). *Vibrio alginolyticus* no solo se ha relacionado con enfermedades de peces, sino que ha sido asociada con la producción de toxinas en productos marinos (Mayer & Ward, 1991); y actualmente es reconocida como patógeno de humanos, relacionándose con infecciones de oídos y heridas (Schmidt et al., 1979). También en estos casos *Vibrio alginolyticus* no se presenta como patógeno primario, por lo que su papel dentro de la infección no ha sido bien definido (Schmidt et al., 1979). Y a pesar de haber sido aislada de productos marinos,

durante los meses cálidos, no se ha relacionado con la expresión de gastroenteritis clínica (Ward & Cameron, 1991).

En México la diagnosis y el tratamiento de las enfermedades en granjas de piscicultivo, se basa principalmente en el conocimiento adquirido en el extranjero con las especies que hasta ahora han sido introducidas a nuestro territorio con fines de cultivo. La única publicación con que se cuenta sobre el tema, es un reporte publicado por Jiménez *et al.* (1986), en donde se menciona la presencia de septicemias en bagre (*Ictalurus sp.*) cultivado, principalmente.

3. JUSTIFICACIÓN

En las pasadas dos décadas, el estudio de las enfermedades bacterianas de peces, ha adquirido gran importancia debido a problemas urgentes en la acuicultura marina y a las epizootias que se presentan ocasionalmente en poblaciones naturales (Sindermann, 1990). Desafortunadamente para estas últimas, el estudio de las causas así como su dinámica ha sido poco desarrollado y pocas medidas pueden tomarse para su control y erradicación, excepto, por supuesto, el control de la contaminación de ríos y mares, asumiendo que cuando el ambiente es deteriorado, se provoca "stress" en las poblaciones naturales, lo que favorece la presencia de enfermedades (Sindermann, 1990).

El conocimiento de las enfermedades de peces es una herramienta útil para interpretar su efecto como factor denso-dependiente en la dinámica poblacional de peces marinos y para explorar la presencia de enfermedades y anomalías de peces como indicadores de degradación ambiental y riesgos humanos potenciales, así como para comprender el efecto que puede tener la introducción y manejo de especies exóticas en la transferencia y propagación de enfermedades (Sindermann, 1990).

El énfasis del estudio de las enfermedades de peces cultivados, se debe al alto valor de estos organismos y a las pérdidas económicas atribuibles a enfermedades bacterianas, las que no solo se deben a la mortalidad causada por patógenos, sino por la reducción de valor de los peces como alimento para humanos (Sindermann, 1990).

Para el desarrollo de la piscicultura en México, no solo se contempla la introducción de las especies que hasta ahora han sido cultivadas con éxito en otros países, sino la incorporación de peces nativos cuyas características las hacen buenos candidatos al cultivo.

En el país existen diversas instituciones que abocan sus esfuerzos al desarrollo de tecnologías para el cultivo de peces marinos de importancia comercial o en peligro de extinción. En el Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, el estudio de peces con miras hacia su cultivo tiene origen desde 1989 a partir de entonces se han abordado aspectos de la biología básica, mantenimiento y reproducción de 22 especies marinas. Actualmente, con la construcción y equipamiento de la Unidad Piloto de Maricultivos (UPIMA), se explora la factibilidad del cultivo de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. Esta especie es un desovador parcial de huevos pelágicos, los cuales flotan mediante un glóbulo de aceite (Oda *et al.*, 1993). En base a ello se ha desarrollado un sistema parcialmente cerrado en el cual los reproductores son mantenidos desovando mediante control de parámetros ambientales, los huevos son colectados en una red mediante la recirculación del agua dentro del sistema (Anguas *et al.*, 1991).

Este sistema de inducción al desove presenta ventajas sobre otros sistemas en cuanto a producción de huevos ya que de él se obtienen de 10,000 a 80,000 huevos por tanque/desove y los reproductores son mantenidos desovando cada 2-3 días por periodos largos de tiempo únicamente mediante el control de parámetros ambientales (Rosales *et al.*, 1992). Sin embargo después de un período largo en el que los peces son mantenidos en desove, se han manifestado brotes de enfermedad en el cual parte del lote es perdido (Anguas *et al.*, 1993). Durante la cría de larvas y juveniles de esta especie, la limitante para la producción masiva de organismos ha sido la presencia de enfermedades de causas hasta ahora supuestas pero no demostradas, las cuales generan altas tasas de mortalidad durante las primeras etapas de desarrollo (Anguas *et al.*, 1992; Anguas *et al.*, 1993).

Las enfermedades en la cabrilla arenera han mostrado ser un factor limitante de su cultivo, los avances en la comprensión de las causas que determinan su presencia, serán el soporte de las medidas profilácticas y de control sanitario a

emplear dentro de las tecnologías de cultivo, no solo con el propósito de contrarrestar pérdidas económicas sino para prevenir algún efecto adverso de las granjas sobre el ambiente, así como la presencia de enfermedades zoonóticas en esta especie la cual se piensa destinar para consumo humano.

Las mayores pérdidas económicas debidas a enfermedades bacterianas son las ocasionadas por *Vibrio*, el estudio de las vibriosis dentro de las tecnologías de piscicultura en desarrollo es una parte esencial, con el fin de evitar futuros problemas cuya repercusión pudiese ser económica.

El estudio de las enfermedades bacterianas de peces es un aspecto del cultivo que ha sido poco explorado en México. La detección, prevención y control de infecciones de peces es una parte importante para su cultivo experimental, ya que las pérdidas por muertes no explicadas dentro de los sistemas experimentales, pueden reducir el presupuesto designado a la investigación y propiciar retraso y alteración de los resultados obtenidos. Por lo que es necesario establecer un cuadro de las enfermedades de la cabrilla, con el fin de evaluar el estado de salud de los peces que serán sometidos a experimentación.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar si las bacterias asociadas a la condición hemorrágica-ulcerativa de la cabrilla arenera desarrollada en una población de reproductores; son el agente causal de dicha condición.

4.2 Objetivos particulares

- 1 .- Describir los síntomas desarrollados en cabrillas enfermas.
- 2.- Aislar e identificar las principales bacterias asociadas con la enfermedad.
- 3.- Evaluar la capacidad de las bacterias aisladas de reproducir los síntomas de enfermedad al ser inoculadas *via* intraperitoneal en peces sanos.
- 4.- Determinar las diferencias entre peces sanos y enfermos en cuanto al contenido de leucocitos en sangre.

5. POSICIÓN TAXONÓMICA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE *Paralabrax maculatofasciatus* (STEINDACHNER, 1868)

Phyllum Chordata

Subphyllum Vertebrata

Clase Osteichthyes

Superorden Acanthopterygii

Orden Perciformes

Suborden Percoidei

Familia Serranidae

Genero *Paralabrax*

Especie *P. maculatofasciatus*

La cabrilla arenera *P. maculatofasciatus* se distingue de los demás miembros del genero *Paralabrax* por la elongación de la tercera espina dorsal. El cuerpo y aletas son moteadas con puntos difusos de color negro, café y naranja, que forman de 6 a 7 barras oscuras. Una barra oscura se extiende en diagonal hacia abajo del ojo. Presenta puntos oscuros en la base de las aletas pectorales. D.X,13-14; A.III,6-8 (Thompson et al., 1979).

Distribución.- Se encuentra distribuida desde la parte central de California a Cabo San Lucas y Mazatlán, siendo mas común en la porción norte del Golfo de California donde su distribución es hasta los arrecifes ubicados mas al norte y menos común en la parte sur del Golfo de California (Miller & Lea, 1972).

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. *Descripción del sistema recirculatorio de inducción al desove*

6.1.1. *Lote de reproductores*

Los organismos del estudio fueron un lote de reproductores colectados mediante piola y anzuelo en la ensenada de La Paz. Los organismos fueron colectados de septiembre a diciembre de 1991 e introducidos en el sistema de inducción al desove del laboratorio de Biología Experimental del CICIMAR-IPN

6.1.2. *Características de/ sistema y condiciones en que se propicia el desove.*

6.1.2.1. *Calidad de/ agua en el sistema*

El abastecimiento de agua de mar para el laboratorio, es por medio de un pozo de filtración con capacidad de 15 m³ ubicado en la playa dentro de los terrenos del CICIMAR aproximadamente a 5 metros del nivel medio de mareas. El agua se filtra de manera natural a través de la arena de la playa, lo que previene la entrada de organismos al laboratorio.

Del pozo, el agua es bombeada a un recipiente de fibra de vidrio con capacidad de 1000 l de los cuales mediante gravedad es introducida al sistema.

Para el llenado y recambio de los tanques, el agua es pasada a través de un filtro de 35 µm.

6.1.2.2. *Recambios de/ Agua*

Para mantener buena calidad del agua, se realizan recambios del 10 al 30 % diario al sistema y esporádicamente se recambia del 80 al 100 % para su limpieza.

6.1.2.3. *Carga biológica.*

El número de peces dentro del sistema varía entre 8 y 10 por cada tanque de 1100 litros. Lo cual representa una carga promedio de 1577 gramos de pez por metro cúbico de agua.

6.1.2.4. Temperatura de/ sistema.

La temperatura dentro del sistema es mantenida aproximadamente a 23.5 °C (23.48±0.3319) mediante 8 termostatos sumergibles Ebo-Jager de 250 wats (ver, Pag. 85 Apéndice 2). El sistema recirculatorio se encuentra dentro de un área húmeda en la que la temperatura es regulada mediante aire acondicionado.

6.1.2.5. Salinidad

La salinidad dentro del sistema varía de manera natural, debido a cambios en el ambiente, encontrándose en promedio en 32.25±0.3697 ‰ (ver Pag. 85 Apéndice 2)

6.1.2.6. Oxígeno

Se tiene aireación constante mediante difusores en cada uno de los tanques, y dentro del filtro biológico el agua es rebotada por dispersión en las bio-esferas. La concentración de oxígeno se mantiene en 5.8±0.2 mg/l.

6.1.2.7. Nitritos y amoníaco

Dentro del sistema de inducción al desove se realizaron mediciones puntuales de rutina, las concentraciones de esos compuestos se mantuvieron en $[\text{NO}_2]=1.045\pm 0.324$ ppm, $[\text{NH}_3]=0.0357\pm 0.022$ ppm.(ver Pag 85, Apéndice 2)

6.1.2.8. pH

El pH fue medido ocasionalmente, registrándose en 7.95±0.05.

6.1.3. Sistema recircula torio

El sistema de inducción al desove consta de 4 tanques cilíndricos de 1100 litros (120 cm de diámetro x 114 cm de altura) de fibra de vidrio y 4 acuarios de cuarentena de acrílico de 100 x 35 x 30 cm, el agua dentro del sistema es recirculada mediante una bomba de 3/4 HP de potencia, el volumen de agua recirculada es de 6000 litros (Fig. 1).

El agua ingresa a los tanques y acuarios mediante tubos de PVC de 1.5" y llaves de 3/4" colocadas lateralmente; de los tanques ésta es drenada por el centro mediante desbordamiento y de los acuarios mediante un desbordador por vasos comunicantes.

El agua saliente de cada tanque es pasada por un filtro mecánico de cartucho de 16 μm e ingresa a un filtro biológico que consiste de dos tanques semi-cilíndricos, que contienen bio-esferas como sustrato de fijación para bacterias. El volumen de agua dentro del filtro biológico es de aproximadamente 1000 l.

De cada acuario el agua es pasada por un sistema de escurrimiento a través de una reja para ser esparcida sobre las bio-esferas.

El sistema cuenta con un espumador de albúminas de 0.15 m de diámetro x 1.5 m de alto.

Los desechos de alimento no consumido, así como las heces son sifoneadas diario durante el recambio de agua.

6.1.4. Aireación

El aire es bombeado al laboratorio mediante una sopladora de 5 HP y distribuido en los tanques y acuarios mediante difusores centrales.

6.1.5. Iluminación

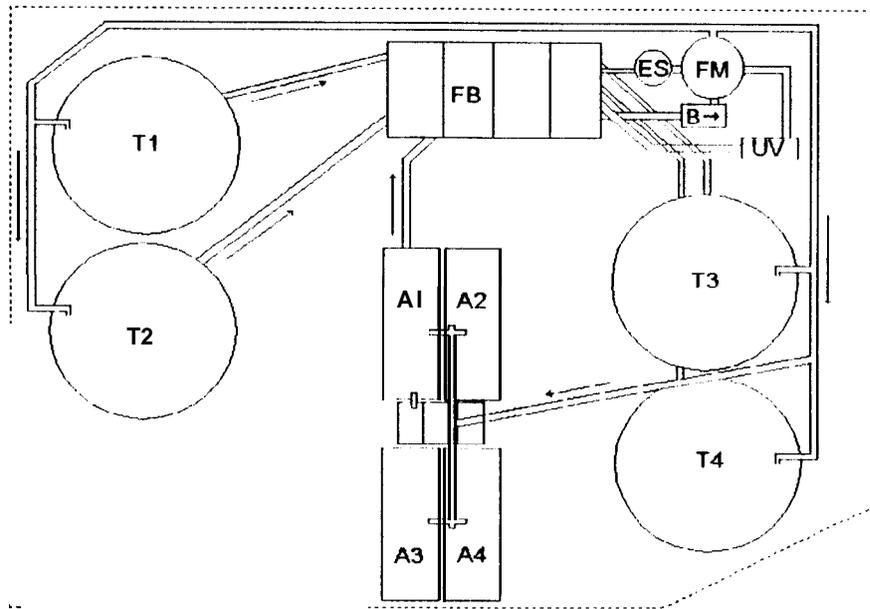
La iluminación del sistema es controlada artificialmente mediante interruptores automáticos; consta de 12 lamparas de tubos fluorescentes tipo "grolux". El fotoperiodo artificial es de 13: 11 luz: 1 oscuridad.

6.1.6. Alimentación

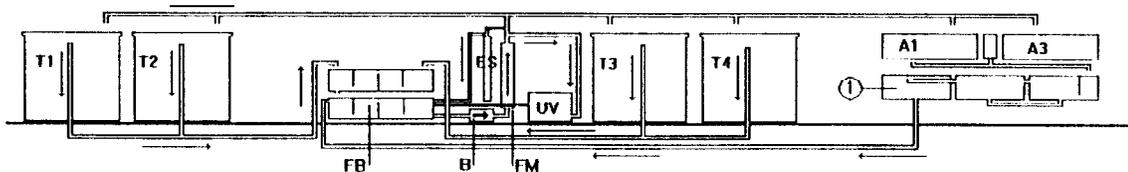
El alimento de los reproductores consta de trozos de pescado, proporcionados a saciedad una vez al día por las mañanas.

Tabla 3. Régimen de mantenimiento del sistema recirculatorio

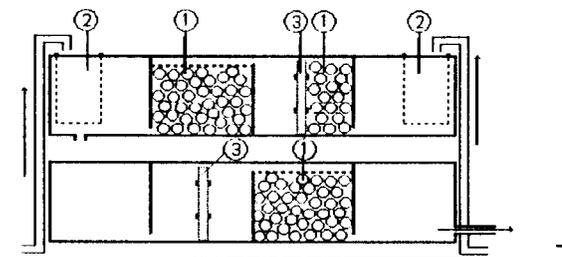
Actividad	Hora																							
	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	1	2	3	4	5
Colecta de huevos																								
Alimentación																								
Limpieza del fondo de los tanques																								
Recambio de agua																								
Recirculación																								
Desove																								



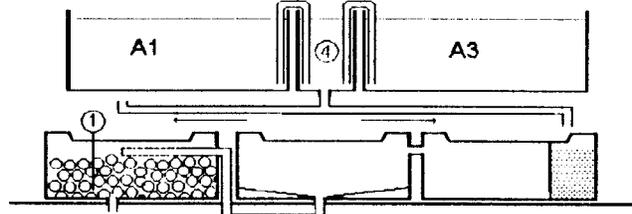
VISTA SUPERIOR DEL SISTEMA



DIRECCION DEL FLUJO



CORTE DEL FILTRO BIOLÓGICO



DISTRIBUCION DE LOS ACUARIOS

SIMBOLOS

T 1,2,3,4 TANQUES EXPERIMENTALES
 A 1,2,3,4 ACUARIOS (1.00 X 0.30 m)
 FB FILTRO BIOLÓGICO
 FM FILTRO MECANICO
 B→ BOMBA DE AGUA (0.25 HP)
 ES ESPUMADOR DE ALBUMINAS
 UV LUZ ULTRAVIOLETA

① BIO-ESFERAS
 ② RED COLECTORA DE HUEVOS
 ③ FILTRO DE HULE ESPUMA
 ④ DESAGUE DE LOS ACUARIOS

Figura 1.- Esquema del Sistema Recirculatorio de Inducción al Desove del Laboratorio de Biología Experimental.

6.2. Caracterización de los síntomas de peces enfermos

Para describir los síntomas de la enfermedad se realizó una contrastación de los síntomas externos e internos y cambios de comportamiento presentes en peces de la especie *Paralabrax maculatofasciatus*, afectados durante un brote en julio de 1992 en las sistema de inducción al desove del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del IPN.

Los organismos enfermos se colocaron separados, en acuarios de cuarentena de 60 l para su observación, estos fueron mantenidos con las mismas condiciones del sistema donde se presentó la enfermedad ($23 \pm 1^\circ\text{C}$ y regulación del fotoperiodo). Durante el tiempo de observación, a los peces se les ofrecieron trozos de pescado fresco como alimento.

El tiempo de observación fue de 24-48 horas.

De cada organismo se tomó una muestra de sangre de la vena caudal por medio de jeringa tipo insulina y se realizaron dos frótis que se tiñeron con colorante de Wright (Merk).

6.3. Aislamiento e identificación de bacterias

Posterior al tiempo de observación, tanto los peces sanos como los enfermos fueron sacrificados en condiciones asépticas por decapitación parcial, haciendo una incisión dorsal a la altura del opérculo en la región entre el cerebro y el cordón espinal (como ilustran Jiménez et al., 1986).

El equipo de disección fue previamente esterilizado en autoclave a 120°C y 15 lb/pulg² durante 20 minutos. Las superficies fueron desinfectadas con alcohol o benzal, antes de realizar algún corte. Para tomar inculo de los órganos, primero se cauterizó la superficie con el bisturí al rojo vivo y posteriormente se introdujo el asa bacteriológica en el órgano a través de la región cauterizada.

Los aislamientos bacterianos fueron realizados por medio de estría cruzada en

placa, a partir de: Sangre, Piel (ulceraciones), Ojos, Branquias, Hígado y Riñón; en los medios sólidos: a) Triptona-Soya-Agar (TSA), b) Triptona-Soya-Agar (TSA)-25ppm NaCl, c) TCBS, d) EMB y e) EMB-25 ‰ NaCl; por duplicado.

Los medios se incubaron a 35° y 25° C durante 24-48 horas.

Las colonias más abundantes fueron purificadas y caracterizadas en base a la morfología colonial, microscópica, tinción de Gram, crecimiento a 41 ± 1°C y crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl (0,30,60,80 y 100 ‰).

Las cepas aisladas fueron mantenidas en agar inclinado (de Medio Marino) (Ver apéndice -pagina 76-).

Paralelamente, el mismo procedimiento de aislamiento se realizó con peces sanos, de los que se procesó sangre, hígado, riñón y estómago. Asimismo se realizó el análisis de infecciones focales de lesiones producidos durante la captura, manipulación y marcado de los organismos.

Para la identificación de la cepas, se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas en tubo a) Reducción de Nitratos, b)Rojo de Metilo (RM), c)Citrato (CIT), d)Agar hierro triple azúcar (TSI), e)Agar Kligler (KIA), f)Reacción de Oxidación-Fermentación de Sacarosa (OF) g)Descarboxilación de Aminoácidos (Lisina, Ornitina, Arginina), h)Motilidad e i)Reacción de Voges Proskauer.

Además de las pruebas bioquímicas en tubo, se utilizó el sistema API-NFT preparado a) con las indicaciones del fabricante y b) ajustado la salinidad del medio base a 25 ‰ de NaCl. En algunos casos la identificación fue corroborada con API-20. Para la identificación se utilizaron los esquemas y tablas de diagnóstico de Mac Faddin (1980), Austin & Austin (1987), Austin (1988), Baumann *et al.* (1984), Gallardo *et al.* (1992), Hendrie & Shewan (1979), Muroga *et al.* (1987) y Frerichs (1984).

Cada una de las técnicas así como la composición de los medios se describe en el apéndice 1.

6.4. Determinación de la patogenicidad de las bacterias aisladas

La determinación de la patogenicidad de las cepas aisladas consistió en la determinación de su capacidad para infectar a peces “aparentemente sanos” (inducción experimental de la infección), colectados del campo y aclimatados a las condiciones de laboratorio, para ello se realizaron los siguientes pasos.

6.4.1 Colecta y Aclimatación de los organismos experimentales

Los organismos de experimentación de la especie *P. maculatofasciatus* fueron colectados mediante anzuelo y con arrastres de 10 a 20 minutos con red de prueba tipo camaronera de 9 m de largo, con una amplitud de boca de 8 m, abertura efectiva de trabajo de 4 m, puertas metálicas de 0.95 x 0.5 m y luz de malla de 3 cm.

La zona de colecta se ubicó en la Ensenada de La Paz B.C.S. (Fig. 2).

Los organismos colectados fueron llevados al laboratorio donde se les dio un baño de agua dulce por 15 minutos, con el propósito de combatir parásitos externos y fueron mantenidos en tanques circulares de 1500 litros y en acuarios de 100 litros a densidad de 15 peces/recipiente durante 3 meses. En los tanques se colocaron organismos adultos con peso promedio de 140 gramos y en los acuarios juveniles con peso promedio de 10 gramos. Los tanques fueron acondicionados con aireación y los acuarios con filtro externo y aireación. Los peces adultos fueron alimentados a saciedad con trozos de pescado fresco y almejas y los juveniles con *Artemia* salina, pescado y almejas. Para mantener buena calidad del agua, a cada recipiente se le realizó recambio diario del agua y se retiró el alimento no ingerido.

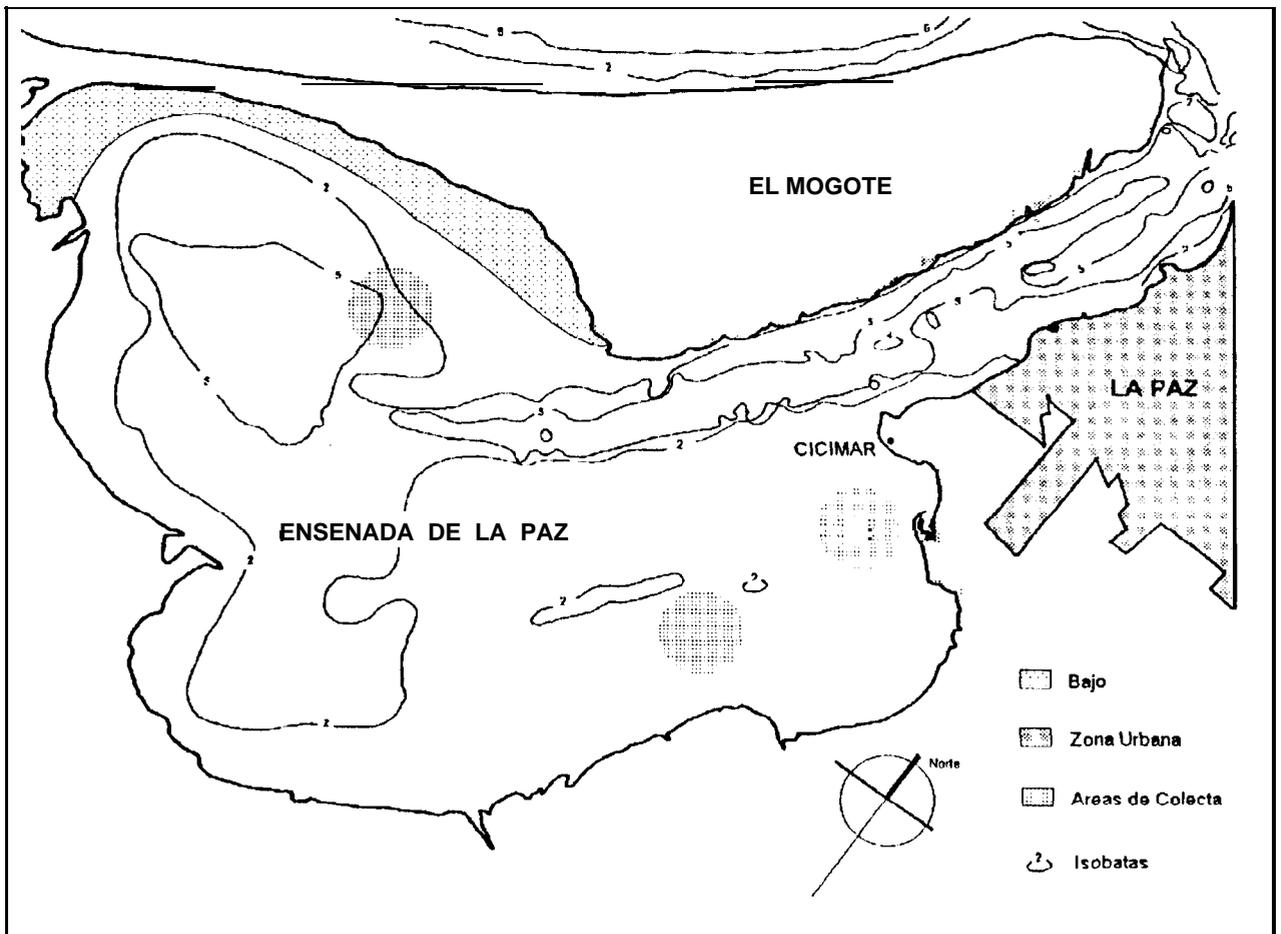


Figura 2.- Zonas de colecta de los organismos experimentales.

Previo a los ensayos de patogenicidad, los peces fueron aclimatados a condiciones de laboratorio (regulación de fotoperiodo 13:11 (Luz : Oscuridad), 22 ± 1 °C de temperatura) durante 3 semanas, en acuarios de 100 litros con aireación a los que se hizo recambio diario del agua.

De cada organismo adulto, se tomó una muestra de sangre de la vena caudal con la que se realizaron 2 frotis, en total se sangraron 48 organismos. Los frotis se tiñeron con colorante de Wright (Merk) ajustándose a los tiempos con los que se obtuvieron mejores resultados, se probaron diferentes soluciones reguladoras de pH conforme a la literatura. Los tiempos de tinción que proporcionaron mejores resultados se describen en el anexo 1 (Pagina 82).

6.4.2. Inducción experimental de la infección (Ensayos 1 y 2)

Ensayo 1.-

Con un cultivo de **24** horas en medio Agar Marino de *Vibrio alginolyticus* (**C7**) se prepararon dos suspensiones celulares (inóculo) en solución salina **0.85 % NaCl**; la primera (inóculo 1) fue ajustada a la turbidez estándar del Nefelómetro de MacFarland (estándar 0.5 de MacFarland) (Ver apéndice Pagina 82.); y la segunda (inóculo 2) se obtuvo haciendo una dilución al 50 % de la primera suspensión con solución salina **0.85 % NaCl**.

Los peces fueron anestesiados con Etil m-Aminobenzoato metanosulfonato (MS222 tricaína) 0.85 mg/l de agua de mar y posteriormente inyectados vía intraperitoneal con 0.1 ml de inóculo. Por cada inóculo se utilizaron tres peces. Los controles de la inyección consistieron de 3 organismos inyectados con 0.1 ml de solución salina estéril (0.85 % NaCl) y los controles del experimento de 3 peces sin inyectar sometidos al mismo proceso de anestesia.

Los peces fueron colocados en acuarios de 90 litros acondicionados con aireación, manteniéndose a 22 ± 1 °C. Durante el tiempo de experimentación los organismos fueron alimentados por las mañanas a saciedad con trozos de pescado fresco.

Ensayo 2.-

Con cultivos de 24 horas en medio TSA de *V. alginolyticus* Cepa 7, *V. alginolyticus* Cepa 13, *Vibrio sp* Cepa 14, *Vibrio vulnificus* Cepa 10 y *Acinetobacter sp.* Cepa 1; se prepararon suspensiones celulares (inóculos) en solución (0.85 % NaCl). Ajustando la densidad de microorganismos a la turbidez estándar del Nefelómetro de MacFarland (estándar 0.5 de MacFarland).

3 peces por cada cepa fueron anestesiados e inoculados como se describe anteriormente. Los controles consistieron de 3 organismos inyectados con 0.1 ml de

solución salina esteril (0.85 % NaCl) y 3 sin inyectar.

Los peces inoculados fueron transferidos a acuarios de 90 litros acondicionados con aireación, manteniéndose a 22 ± 1 °C. Durante el tiempo de experimentación los organismos fueron alimentados por las mañanas a saciedad con trozos de pescado fresco.

Se hicieron registros diarios durante 20 días de la mortalidad observada, así como los cambios en el comportamiento y aparición de hemorragias externas.

El experimento fue realizado dos veces bajo condiciones semejantes.

A los organismos que mostraron síntomas de enfermedad se les mantuvo en observación hasta el momento de la muerte, registrándose los síntomas producidos. En dicho momento se tomó una muestra de sangre de la vena caudal con la que se realizaron 2 frotis, los que se tiñeron con colorante de Wright (Merk).

Se realizó el análisis postmortem de los organismos para determinar síntomas presentes. Una muestra del hígado y riñón de los peces muertos fue inoculada en placas de TSA-20ppm NaCl y TCBS, e incubada a 35 °C por 24 h. Las cepas aisladas fueron caracterizadas bioquímicamente e identificadas.

6.4.3. Ensayo 3. Determinación del número mínimo de bacterias capaces de inducir una patología clínica.

Con la cepa con la que se obtuvieron resultados positivos en el ensayo 2 de patogenicidad (*V. alginolyticus* Cepa 7), se prepararon 4 suspensiones celulares (inóculos) a concentraciones de 1.05×10^6 , 1.05×10^7 , 1.05×10^8 y 1.05×10^9 , bacterias/ml en solución salina estéril (0.85 % NaCl); a partir de cultivos de 24 horas en medio TSA.

De cada suspensión se realizó una cuenta viable en placa, para ello se realizaron 10 diluciones decimales en solución salina estéril (0.85% NaCl), de cada dilución se inoculó 0.1 ml en medio TCBS por triplicado.

Con cada suspensión, se inocularon vía intraperitoneal 6 peces previamente anestesiados como se describe en el ensayo 1. Los blancos del experimento, consistieron de 6 peces inyectados con 0.1 ml. de solución salina estéril (0.85 % NaCl) vía intraperitoneal y 6 organismos no inyectados.

Del mismo modo que en la fase 1, los peces inoculados, fueron transferidos a acuarios acondicionados con aireación y temperatura controlada 22 ± 1 °C. Se hicieron observaciones por un tiempo de 20 días para registrar cualquier mortalidad.

6.5. Comparación de parámetros sanguíneos en organismos sanos y enfermos.

Con los frótis preparados de organismos sanos (del lote de peces acondicionados; Pag. 26), se realizó el conteo diferencial de leucocitos. Los conteos se realizaron en microscopio óptico 100x. La identificación de las células sanguíneas se realizó en base a las descripciones de Roberts (1978), Gromon (1982), Yasutake & Wales (1983) y Houston (1990).

Con los conteos se determinó el porcentaje medio de linfocitos, monocitos y granulocitos. El mismo procedimiento se realizó con organismos enfermos.

Para evaluar el porcentaje de trombocitos (plaquetas) se implementaron las siguientes técnicas: 1.- Conteo directo con cámara de Newbauer a una dilución 1:200 en oxalato de amonio al 1 % con pipeta para glóbulos rojos y 2.- Conteo indirecto mediante frotis teñidos con PAS (Técnica del Ácido Periodico de Shift) y 3.- Tinción de Romanowski (Wright, 1902); Las tres técnicas se describen en el apéndice 1.

Con los conteos diferenciales en peces sanos se determinó la normalidad mediante la prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov; se estimó el porcentaje medio normal y su intervalo de tolerancia al 95 % de confianza mediante el estimador de los límites.

$$L = x \pm \left[t_{0.05[n]} \left(\frac{s}{\sqrt{n}} \right) \right]$$

La diferencia en los porcentajes entre peces sanos y enfermos se evaluó mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney y Wilcoxon. La significancia de U se evaluó mediante el estimador de t:

$$t_s = \frac{\left(U_s - \frac{n_1 n_2}{2} \right)}{\sqrt{\left(\frac{n_1 n_2}{(n_1 + n_2)(n_1 + n_2 - 1)} \right) \left(\frac{(n_1 + n_2)^3 - (n_1 + n_2) - \sum T_j}{12} \right)}}$$

7. RESULTADOS

7.1. *Calidad del agua*

Con excepción de los nitritos, los parámetros registrados (Tabla II) **mostraron** valores promedio cercanos a valores recomendados para especies de **aguas** tropicales (Stickney & Kohler, 1992). Los niveles de nitritos considerados como tóxicos, varían con la especie, niveles menores a 0.5 mg/ml se consideran seguros, aunque algunas especies tropicales parecen tolerar concentraciones de varios miligramos por litro, por intervalos cortos de tiempo (Stickney & Kohler, 1992). De este modo, el comportamiento general de los principales parámetros de la calidad del agua, en el SRID tuvieron un comportamiento que consideramos seguro para la especie estudiada.

7.2. *Síntomas desarrollados en el lote de reproductores*

El proceso infeccioso se desarrolló de manera espontánea en un lote de reproductores, posterior a 20 días de baño en formol a 0.05 ml/l. A partir del momento en que fue detectado el primer organismo enfermo y hasta el cuarto día, se registró una mortalidad de más del 40 % de los peces.

Los organismos afectados naturalmente se observaron inactivos y torpes, se presenta anorexia y aumento del ritmo respiratorio. Externamente hay oscurecimiento de la piel, pérdida y levantamiento de escamas, hemorragias y ulceración en la piel: principalmente en la región pélvica y en opérculos, las aletas presentan hemorragias severas y erosión, se observa opacidad de ojos, acumulación de mucus y en algunos peces erosión de la línea lateral. Internamente se observan hemorragias sobre la vejiga gaseosa e intestinos, el intestino se encuentra lleno de una sustancia líquida transparente especialmente hacia la región rectal y el hígado se observa descolorido (Fig. 3).

7.3. Aislamiento de bacterias

7.3.1. Organismos con síntomas de infección sistémica.

Se obtuvieron aislamientos de las superficies ulceradas, hígado, riñón y sangre de los organismos enfermos. En total se aislaron 26 cepas, de las distintas fuentes. En base a la caracterización, se redujo de 26 a 11 cepas para identificación (Tabla 6). Como muestra la tabla 4 con el medio EMB simple no se obtuvo ningún aislamiento a partir de ninguna de las fuentes.

7.3.2. Organismos con infecciones focales

De las zonas ulceradas y pus se aisló *V. alginolyticus*. De la sangre no se obtuvo crecimiento bacteriano.

7.3.3. Organismos sanos

Con peces sanos, en ninguno de los medios y a partir de ninguna de las fuentes utilizadas, se obtuvo crecimiento bacteriano.

Tabla 4.- Número de cepas aisladas para cada una de las fuentes utilizadas y por cada medio empleado.

FUENTE	MEDIO				
	TSA-2.5	TSA	TCBS	EMB	EMB-2.5
SANGRE	2	ND	1	ND	ND
ÚLCERAS	SW	2	2	NC	NC
BRANQUIAS	2	3	2	NC	2
HÍGADO	2 SW	2	4	NC	2
RIÑÓN	1	ND	1	ND	ND

ND-No realizado; NC-No hubo crecimiento; sw-Crecimiento en toda la placa.

Todas las cepas aisladas tuvieron la capacidad de crecer en TCBS incluyendo aquellas que fueron aisladas en otros medios. La morfología celular de las cepas aisladas fue bacilos o bacilos cortos Gram-negativos, catalasa positivos (Fig. 3h).

Tabla 5.- Fuente y medio de cultivo en el que fueron aisladas las cepas sometidas al proceso de aislamiento.

Cepa	Fuente de Aislamiento			Medio		
	Hígado	Úlceras	Branquias	TSA+2.5 ‰ NaCl	TCBS	EMB+2.5 ‰ NaC
1	X				X	
3	X				X	
6	X				X	
7	X					X
8		X			X	
9		X			X	
10		X			X	
11			X		X	
12			X		X	
13	X			X		
14	X			X		

7.4. Identificación de /as bacterias aisladas

Las cepas aisladas de peces enfermos fueron identificadas como *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Acinefobacter sp.* y *Vibrio sp.* (Tabla 7a y 7b).

V. alginolyticus, se aisló a partir del hígado, ulceraciones, branquias, sangre y fue la única especie aislada del riñón.

En base a sus diferencias bioquímicas y morfológicas las cepas identificadas como *V. alginolyticus* se dividieron en 3 (Cepa 7, 8 y 13) con 46 características en común y 11 características variables.

Tabla 6.- Caracterización Bioquímicas de las cepas

CARACTERÍSTICA	CEPA										
	1	3	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Gram					-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Forma	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
Oxidacion-Fermentación				F	F	F	F	F	F	F	F
Medio especial para crecimiento			--	--		-	-	-	-	-	-
Oxidasa				+	+	+	+	+	+	+	+
Motilidad		+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Pigmentación					-	-	-	-	-	-	-
Omitin-Descarboxilasa	nd	nd	nd	+	-	-	+	-	+	+	+
Arginina-Desaminasa	nd	nd	nd	-	-	-	-	-	-	-	-
Lisina-Descarboxilasa	nd	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
TSI (EP)	k/a	a/a	k/k	k/a							
KIA (EP)	k/a	k/a	k/k	k/a							
Producción de gas	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Rojo de Metilo	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Vogues Proskauer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reducción de nitratos (Tubo)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento a 42° C	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento a 0 % de NaCl	±	+	±	±	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento a 3 % de NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento a 6 % de NaCl	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento a 8 % de NaCl	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento a 10 % de NaCl	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento en TCBS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

B= Bacilos; F= Fermentativo, nd= No realizado.

Tabla 7a.- Resultados de la identificación con API-NFT

PRUEBA	CEPA						
	7	8	10	11	12	13	14
Reducción de Nitratos	+	+	+	+	+	+	+
Triptofanasa	+	+	+	+	+	+	+
Fermentación de glucosa	+	-	+	-	+	+	-
Arginina hidrolasa	-	-	-	-	-	-	-
Ureasa	-	-	-	-	-	-	-
Hidrolisis de esculin	+	+	+	+	+	+	+
Gelatinasa	+	+	+	+	+	+	+
Beta galactosidasa	-	-	+	-	+	-	-
D-Glucosa	-	+	-	-	+	+	+
L-Arabinosa	-	-	-	-	-	-	-
D-Manosa	+	+	-	-	+	-	-
D-Manitol	+	+	-	+	+	+	+
N-Acetil-D-Glucosamina	+	+	-	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+	+	+	+
D-Gluconato	-	+	-	+	+	+	+
Caprato	-	-	-	-	-	-	-
Adipato	-	-	-	-	-	-	-
L-Malato	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	-	-	-	-	-	-	-
Fenil-Acetato	-	-	-	-	-	-	-
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 7b.- identificación de las cepas

CEPA	CLAVE NFT	IDENTIFICACION	% de Confianza
1	ND	<i>Acinefobacter sp.</i>	ND
3	ND	<i>Pseudomonas pseudoalcaligens</i>	ND
6	ND	<i>Acinetobacter sp.</i>	ND
7	7 4 1 6 3 4 4	<i>Vibrio alginolyticus</i>	99.9
8	3 4 5 6 7 4 4	<i>Vibrio alginolyticus</i>	99.2
9	ND	<i>Vibrio sp.</i>	ND
10	7 4 3 0 2 4 4	<i>Vibrio vulnificus</i>	93.7
11	3 4 1 4 7 4 4	Vibrionaceae	A
12	7 4 7 6 7 4 4	<i>Vibrio sp.</i>	B
13	7 45 4 7 4 4	<i>Vibrio alginolyticus</i>	97.7
14	3 4 5 4 7 4 4	Vibrionaceae	C

Notas:

Con las cepas 1,3 y 6, no se obtiene ningún resultado en la identificación con API-NFT y la cepa 9 perdió la capacidad de crecer.

A.- Baja discriminación

V. alginolyticus % id = 79.8

Aeromonas salmonicida % id = 20.1

B.- Buena identificación a nivel genero

V. alginolyticus % id = 62.3

V. parahaemolyticus % id = 22.5

V. cholerae % id = 12.9

C.- Baja discriminación

V. alginolyticus % id = 73.8

A. salmonicida % id = 26.1

Con API-NFT preparado conforme a las indicaciones del fabricante y el que la salinidad del medio base fue ajustada a 25‰ de NaCl se obtienen los mismos resultados presentados en la tabla 7a.

De acuerdo a la identificación, las bacterias aisladas de los diferentes organos

de los peces enfermos fue de la siguiente manera: *Acinetobacter sp.* y *Pseudomonas pseudoalcaligens* fueron aisladas de hígado, *Vibrio alginolyticus* de úlceras, hígado, riñón y sangre, *V. vulnificus* de úlceras y branquias, *Vibrio sp.* de úlceras (Tabla 8).

Tabla 8.- Fuentes de aislamiento de las bacterias de peces enfermos

Especie	FUENTE				
	ÚLCERAS	HÍGADO	RIÑÓN	BRANQUIAS	SANGRE
<i>Acinetobacter sp.</i>		+			
<i>P. pseudoalcaligens</i>		+			
<i>Vibrio alginolyticus</i>	+	+	+		+
<i>Vibrio vulnificus</i>	+			+	
<i>Vibrio sp</i>	+				
<i>Vibrionaceae</i>		+		+	

7.5 Pruebas de patogenicidad

Ensayo 1.- Después de 20 días de haberse inoculado la cepa 7 (identificada como *V. alginolyticus*) a los peces, no se produjo infección ni daño perceptible; los organismos aceptan el alimento normalmente (Tabla 9a).

Tabla 9a.- Ensayo de patogenicidad de la cepa 7 *Vibrio alginolyticus*.-

Inóculo	<i>Vibrio alginolyticus</i> (Cepa 7)		Blancos	
	1.5 x 10 ⁶	0.75 x 10 ⁶	0.85 % NaCl	No Inoculado
No. de peces	3	3	3	3
Longitud Media (mm)	67	65	65	64
Peso Medio (g)	7.19	6.70	6.72	6.77
Mortalidades Post-inóculo 20 Días	0	0	0	0

Ensayo 2.- En la primer corrida del experimento, no se observan cambios de comportamiento ni mortalidad. En la corrida dos, al día 11, los peces inoculados con la cepa 7, *V. alginolyticus* no aceptan el alimento, se observa aceleración del ritmo respiratorio y petequia en la superficie corporal. Entre el día 12 y 13 se observan hemorragias en las aletas pectorales, derrames en ojos e interior del opérculo. Al momento de la muerte, el intestino está lleno de un liquido transparente y el hígado se observa pálido. *Vibrio alginolyticus* fue aislada del riñón, hígado y estómago, pero no de sangre.

Con las demás cepas durante la corrida dos no se observan cambios en comportamiento, aparición de signos de infección ni mortalidad.

Tabla 9b.- Ensayo de patogenicidad de las cepas 1,7, 10, 12 y 13 *Acinetobacter sp* (*Ac sp*), *V. alginolyticus* (*V. alg*), *V. vulnificus* (*V. vul*), *Vibrio sp.* (*V. sp*), y *V. alginolyticus* (*V.alg*) (corrida 2)

Inóculo	Suspensión de Bacterias					Blancos	
	CI Ac.sp	c7 V. alg	CI0 V. vul.	C12 V.sp	C13 V. alg	NaCl 0.85 %	No Inoculado
Dosis aproximada	5x10 ⁶	5x10 ⁶	5x10 ⁶	5x10 ⁶	5x10 ⁶	-	-
No de org.	3	3	3	3	3	3	3
Longitud Med. (mm)	155	144	142	136	136	142	146
Peso Medio (g)	105.5	80.3	85.0	72.26	73.3	84.3	80.0
Mortalidades Post-inóculo (Días)							
0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0
12	0	1	0	0	0	0	0
14	0	3	0	0	0	0	0
20	0	3	0	0	0	0	0
%Mortalidad	0	100	0	0	0	0	0

*Los inoculos se prepararon ajustando la turbidez al nefelometro de MacFarland (estándar 0.5 de MacFarland).

Ensayo 3.- Con ninguna de las dosis probadas se observan cambios perceptibles ni se presenta mortalidad.

Tabla 9c.- Ensayo de patogenicidad de *Vibrio alginolyticus* cepa 7 a diferentes dosis

Dosis	<i>Vibrio alginolyticus</i> (Cepa 7)				Blancos	
	1.05x10 ⁵	1.05x10 ⁵	1.05x10 ⁷	1.05x10 ⁸	NaCl 0.85 %	No Inoculado
No de org.	6	6	6	6	6	12
Longitud Med.(mm)	89	81	87	84	89	88
Peso Medio (g)	16.81	12.81	15.66	14.68	17.63	17.86
Mortalidades Post-inóculo						
20 Días	0	0	0	0	0	0

7.6. Comparación de los porcentajes de leucocitos en organismos sanos y enfermos

Los tipos celulares que se encontraron en sangre fueron: eritrocitos, linfocitos, trombocitos, monocitos, macrófagos y granulocitos (Fig. 4). Con los polimotfonucleares, no obstante que se observa predominancia de neutrófilos sobre los otros dos tipos celulares (neutrófilos 5.20 %, Basófilos 1.95 % y Eosinófilos 0.47), en algunos casos no se observan diferencias claras en el grado de tinción, por lo que para el análisis no se separan los porcentajes de cada tipo celular.

Las características de las células sanguíneas en *P. maculatofasciatus* se resumen en la Figura 4.

Con la prueba de Kolmogorov-Smirnov se encuentra que los porcentajes de células blancas en la cabrilla arenera están normalmente distribuidos.

El porcentaje medio en peces sanos fue 41.4 % (S=11.4) linfocitos, 47.2 % (S=10.2) trombocitos, 3.6 % (S=2.3) monocitos y macrófagos y 7.85 (S=4.76) granulocitos (n=48); mientras que en peces enfermos fue de 24.8 % (S=1.33) linfocitos, 2.6 % (S=0.8) trombocitos, 70.4 % (S=2.15) monocitos y macrófagos y 2.2 % (S=2.86) granulocitos (n=5).

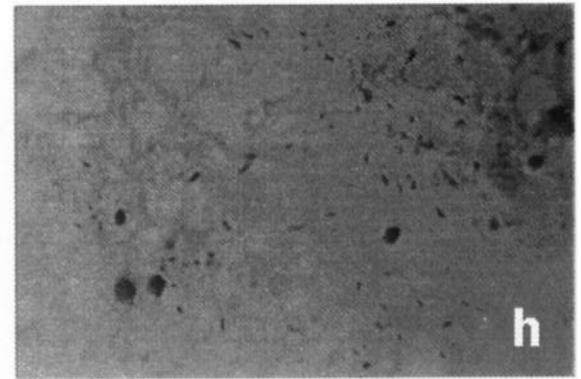
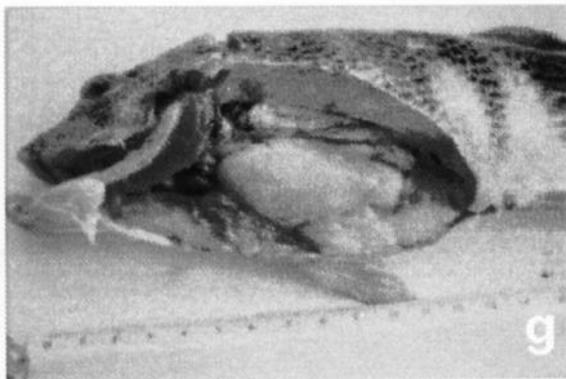
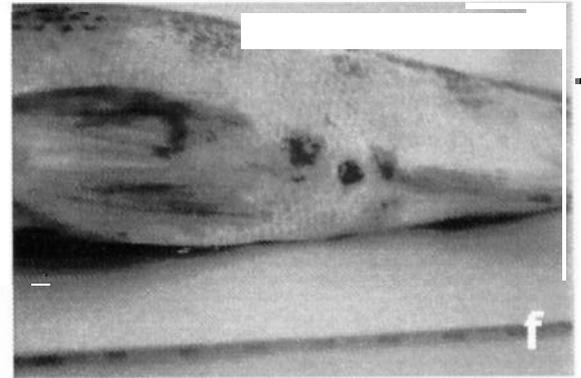
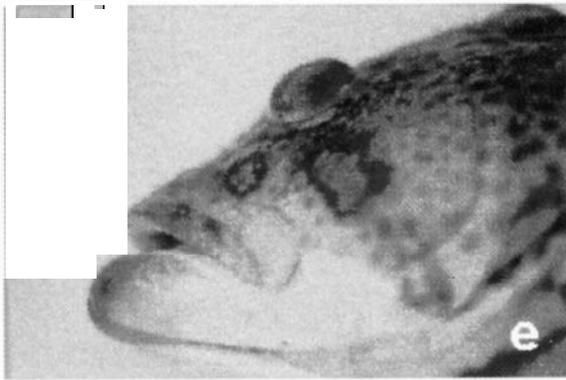
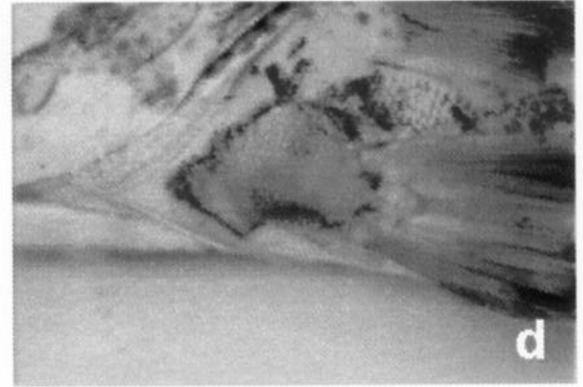
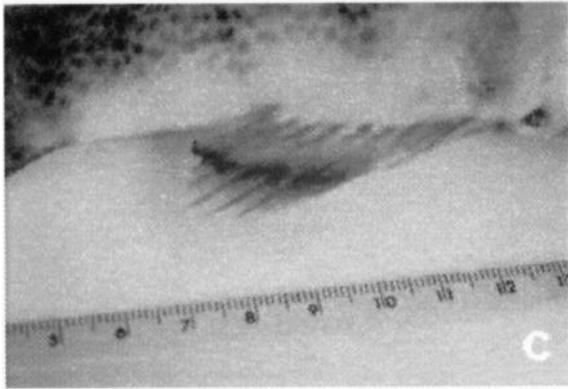
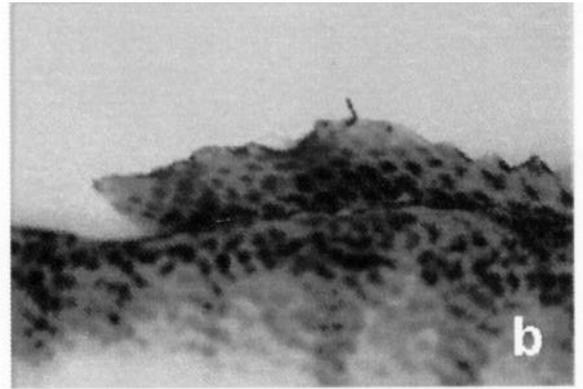
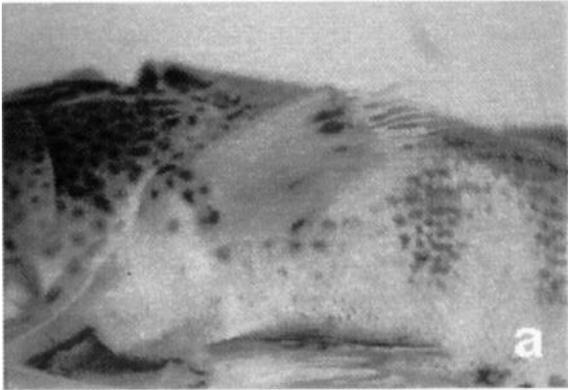
Como se muestra la tabla 10, en peces enfermos se observa un menor porcentaje de linfocitos, trombocitos y granulocitos, así como un mayor porcentaje de monocitos y macrófagos.

Tabla 10 .- Cuento diferencial de leucocitos en peces sanos y enfermos. Entre paréntesis el intervalo de tolerancia al 95 % de confianza.

Parámetro	Unidades	Sanos	Enfermos	Significancia
Linfocitos	%	41.4 (38.07-44.73)	24.8	0.01 < P < 0.001
Trombocitos	%	47.2 (44.22-50.17)	2.6	P < 0.001
Monocitos y Macrófagos	%	3.6 (2.929-4.270)	70.4	P < 0.001
Granulocitos	%	7.85 (6.460-9.238)	2.2	0.02 < P < 0.01

Figura 3.- Síntomas en peces enfermos

- a.- Hemorragias y ulceración de aletas pectorales
 - b.- Hemorragias y ulceración en aleta dorsal
 - c.- Hemorragias y necrosis en aleta anal
 - d.- Úlceras en la base de las aletas pélvicas
 - e.- Zonas de ulceración con hiperhemia periférica en la región opercular
 - f.- Hemorragias alrededor del ano.
 - g.- Hígado decolorado y hemorragias sobre intestinos
 - h.- Presencia de bacilos gram-negativos en hígado
- Foto: 100x Impronta de hígado con tinción de Gram



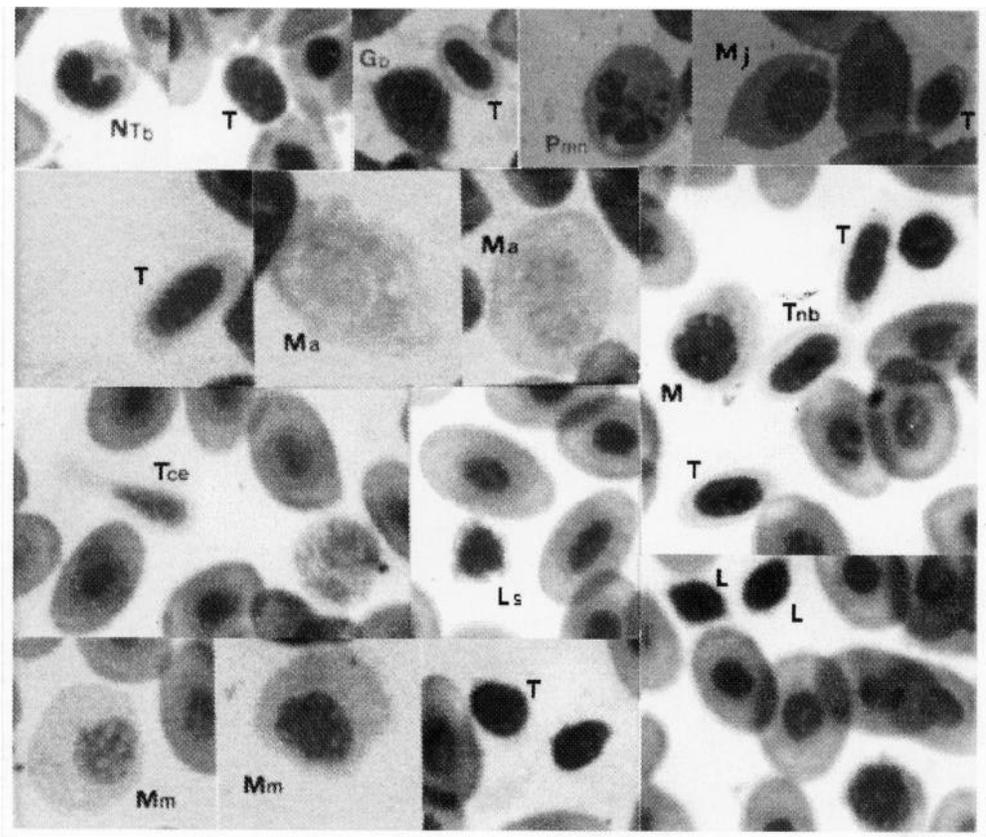


Figura 4. Leucocitos encontrados en sangre de cabrilla.

Símbolos

NTb Neutrófilo en banda

Pmn Polimorfonuclear

T Trombocito

Tnb Trombocito con nucleol bilobulado

Tce Trombocito con citoplasma elongado

Mj Monocito Joven

Mm Monocito maduro

Ma Macrófago

Ls Linfocito con pseudópodos

L Linfocitos

8. DISCUSIÓN

8.1. Síntomas desarrollados en cabrillas enfermas.

Los síntomas desarrollados por la cabrilla durante la condición septicémica observada en el CICIMAR; son semejantes a los descritos en casos de vibriosis por Biosca et al. (1991) en *Anguilla anguilla*; LeaMaster & Ostrowski (1988) en *Coryphaena hyppurus*; Burke & Rodgers, (1981) en *Mugil cephalus*; Colorni et al. (1981) en *Sparus aurata*; Lewis (1985) en *Ictalurus punctatus*; y Ransom, et al. (1984) y Austin & Austin (1987) en salmónidos. En todos estos casos el cuadro sintomático incluye el desarrollo de hemorragias en la superficie corporal, internamente se observa petequia en vísceras y musculatura, el intestino distendido y lleno con un fluido viscoso transparente (Smith, 1988). Este cuadro es acompañado por decaimiento, inactividad y anorexia. Para algunos autores como Post (1987) estos son los síntomas generales desarrollados en infecciones causadas por bacterias gram-negativas.

En cabrillas infectadas naturalmente pudimos observar que las hemorragias y petequia se pueden localizar en todo el cuerpo, aunque mas comúnmente a la altura de la base de las aletas pélvicas, región perianal y opérculo, donde se presentan úlceras con hiperhemia periférica (Fig. 3 d,e f). En la superficie de las aletas se observan hemorragias, congestión hemorrágica en la base, mientras que en los extremos se presenta necrosis y erosión (Fig. 3 a,b,c).

Durante infecciones experimentales con vibrios se reportan diferencias en los síntomas, los cuales incluyen la extensión de hemorragias y úlceras así como la severidad de la infección; y dependen de las especies relacionadas al proceso infeccioso (Harbell 1976; Funahashi et al., 1974; Miyazaki & Kubota 1977; Miyazaki et al., 1977). Dichas diferencias son asociadas a los factores de virulencia bacterianos, así como a la respuesta y susceptibilidad de los peces infectados (Ransom et al.,

1984).

Es necesario enfatizar, **que a pesar de haberse descrito el cuadro sintomático** presente en infecciones producidas por distintas especies de bacterias, no es posible establecer una comparación completa, debido a que muchas veces el autor omite información de las estructuras u órganos que se observan normales (probablemente por asumir que si no se menciona es que no se presentan alteraciones) y porque de manera directa la precisión de la descripción depende de la experiencia con que cuente el autor al momento de realizar la diagnosis, por ello, a pesar de que en un caso particular alguna estructura se observe dañada, existe la duda si puede usarse como característica diagnóstica del padecimiento. Debido a ello se hace necesario adoptar un esquema general (como el sugerido por Ishioka en 1992) en el que al momento de hacer la necropsia se consideren todos los aspectos sintomatológicos relevantes, con lo que sería más fácil establecer una comparación y llevar un seguimiento de la temporalidad de las enfermedades, sobre todo si se piensa en el desarrollo del piscicultivo, en el que la estacionalidad de las enfermedades puede marcar periodos de pérdidas económicas.

8.2. Aislamiento de las bacterias asociadas con la enfermedad

Con los medios utilizados en el aislamiento se obtienen resultados variables, por ejemplo el medio EMB resulta ineficiente para el aislamiento, ello se puede explicar en base a que dicho medio no es propicio para obtener aislamientos directos del mar; este medio es usado para detectar contaminación fecal, la presencia de *Echerichia coli* puede detectarse por crecimiento de colonias con brillo metálico, el cual es producido por la fermentación de la lactosa. Con el medio EMB adicionado con sal marina se logró el aislamiento de 4 cepas a partir de branquias e hígado, en todos los casos el crecimiento es incipiente presentándose en parches irregulares de tamaño variable, mucoides y blancuzcos, lo cual puede ser síntoma de la presencia de

condiciones desfavorables de crecimiento como los colorantes eosina o **azul de metileno** que sirve como inhibidores del crecimiento de algunas bacterias **en el medio EMB**.

El medio TSA resultó ser muy eficiente para el aislamiento y purificación de las bacterias; cuando es complementado con sal marina las colonias de algunas cepas cubren toda la superficie de la placa, característica que puede servir para diferenciar a *Vibrio alginolyticus* de otros vibrios (Baumann et al., 1984).

Como se mencionó en los resultados (Pag. 32) todas las cepas-aisladas de los peces enfermos, tuvieron la capacidad de crecer en TSA, Agar Marino y TCBS. Los dos primeros son medios generales para heterótrofos aerobios mientras que el medio TCBS, por su contenido en sales biliares, inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas, además de haber sido reportado como un medio selectivo para vibrios; esto último es importante considerarlo al obtener aislamientos en dicho medio, ya que muchas veces se considera a cualquier crecimiento en TCBS como diagnóstico de la presencia de vibrios; aunque todos los vibrios poseen la capacidad de crecer en dicho medio existen otras bacterias con capacidad de crecer en él (como se pudo comprobar en el presente estudio), por lo que la diagnosis de vibrios en placas de TCBS debe resultar de algunas otras pruebas confirmatorias y no de la mera presencia de crecimiento.

A pesar de que a partir de órganos internos (hígado, riñón y sangre) solo se obtuvieron aislamientos de peces con síntomas de infección sistémica; ello no indica la ausencia de una flora normal, sino de que los medios empleados pudieron no ser propicios para favorecer su crecimiento.

Es importante mencionar que no se realizó el análisis microbiológico de las superficies corporales de peces sanos debido a que no era el objetivo aislar la microflora de la cabrilla, sino solo establecer un punto de comparación con peces enfermos y que a pesar de tenerse tres fuentes de aislamiento (peces sanos, con

heridas y con síntomas de septicemia) estas no son (y no se pretenden ver así) etapas de la dinámica de la infección, sino solo puntos de comparación de la presencia de bacterias en la cabrilla en estado saludable y septicémico. Como puede observarse durante el aislamiento se encontró una mezcla de bacterias, asociadas a los diferentes órganos de peces enfermos (tabla 8), esta condición es comúnmente encontrada en los estudios de enfermedades bacterianas (Frerichs, 1974; Sindermann, 1990). La explicación es **que algunos de los microorganismos aislados pueden ser parte de la microflora normal del pez o estar asociados al proceso infeccioso solamente de manera oportunista**. Esta consideración es de primordial importancia al analizar cualquier proceso infeccioso, ya que la mera presencia de bacterias en lesiones de peces enfermos, no indica que éstos sean los agentes etiológicos y ni siquiera que puedan ser considerados como patógenas.

8.3. **Identificación de las bacterias aisladas**

La morfología celular de todas las cepas aisladas fue bacilos o bacilos cortos Gram-negativos catalasa positivos (Fig. 3h). Con la prueba de oxidación fermentación de sacarosa, ocho cepas presentaron fermentación y las tres restantes neutras hasta 7 días de incubación.

Las cepas 1 y 6 fueron identificadas como *Acinetobacter sp.* por ser bacilos cortos Gram negativos, catalasa positivos, crecer en medio aerobio, OF-neutras, no presentar movilidad y reaccionar negativamente a oxidasa (McFadin, 1980; Austin & Austin, 1987).

La cepa 3 a diferencia de las cepas 1 y 6 presentó motilidad, por lo que fue identificada como *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. (McFadin, 1980; Hendrie & Shewan, 1979). A pesar de que en este caso, con los esquemas de identificación utilizados se puede concluir que la especie en cuestión es *P. pseudoalcaligenes*, se puede ver que con las características consideradas, otras especies de bacterias que

han sido aisladas del medio marino o como patógenos de peces caerían en la **misma** identificación (v.gr. *Pseudomonas alcaligenes* y *P. anguilliseptica*). Por ello, esta identificación debe tomarse con reserva.

Por su parte las cepas OF-fermentadoras presentaron motilidad a 37°C, no presentan ninguna pigmentación y dieron positiva la oxidasa. Por lo que se consideró que las cepas OF-fermentadoras pertenecen a la familia Vibrionaceae (Frerichs, 1984; Baumann et al., 1984; McFadin, 1980). En la descarboxilación de aminoácidos todas dan resultados positivos en la descarboxilación de lisina y negativos con arginina; con ornitina las cepas 7, 10, 12, 13 y 14 son positivas mientras que las cepas 8, 9 y 11 son negativas. En base a la respuesta de las bioquímicas complementarias y a los resultados obtenidos con API-NFT, fueron identificadas como *Vibrio alginolyticus*, *V. vulnificus*, *Vibrio sp* y en un caso se determinó solo a nivel familia Vibrionaceae. Para las cepas identificadas como *V. alginolyticus* la identificación se corroboró con API-20.

La identificación de los agentes etiológicos en el cultivo de organismos marinos, es una parte importante que puede determinar las medidas de control zoonosario aplicadas en una granja de producción o en un país, a gran escala, el uso de las metodologías tradicionales para la identificación no es práctico por el tiempo requerido para establecer un diagnóstico (Mialhe et al., 1992). La necesidad de contar con metodologías de diagnóstico rápidas, para dar respuesta inmediata a los problemas, plantea la implementación de nuevas técnicas de mayor precisión. Muchos autores sugieren el uso de multipuebas como API-20 (Santos et al., 1993) y API-ZIM (Sakai et al., 1993) o la aplicación de técnicas inmuno-enzimáticas (Lewis, 1981; Alexandra, 1991; Mialhe et al., 1992), inmunológicas (Paterson et al., 1979) y de hibridación de ADN (Vivares & Guesdon, 1992; Mialhe et al., 1992). En el presente estudio, la identificación de las cepas bacterianas, por los métodos tradicionales, en muchos casos no conducen a ninguna identificación, ya que el gran parecido de las cepas de *V. alginolyticus* con *V. parahaemolyticus* hace difícil su diferenciación, a menos que se

cuenta con gran número de pruebas bioquímicas para establecer un diagnóstico. En este caso el uso del sistema API-NFT y API-20 fueron los principales métodos considerados, y las demás pruebas bioquímicas, solo fueron confirmatorias y complementarias. Sin embargo, la identificación de las cepas OF-neutras no fue posible por este medio. Ello sugiere que el uso de API-NFT puede ser restringido a algunos grupos de patógenos en peces, y su uso requiere evaluación, ya que por la salinidad a la que trabaja, pueden presentarse problemas con organismos marinos con requerimientos salinos superiores. En el presente trabajo se-compararon los resultados obtenidos, con los de API-NFT en el que la salinidad del medio base se ajustó a 20 ‰, sin haberse obtenido diferencias, debido a que las cepas en estudio no presentaron requerimientos salinos altos (como se puede ver en la Tabla 6); y tienen la capacidad de crecer en salinidades desde 0 % hasta 10 % de NaCl.

En el presente estudio se destaca la presencia de *Vibrio alginolyticus*, debido a que fue la especie mas comúnmente aislada en infecciones de heridas causadas durante el manejo de la cabrilla, y porque en el brote que se presentó en el lote de reproductores mantenidos en el sistema de inducción al desove fue la especie con mayor incidencia y que coloniza un mayor número de órganos.

En la cabrilla arenera fue posible observar un aislamiento diferencial de las bacterias en los órganos de los peces infectados naturalmente: *Acinetobacter sp.* y *Pseudomonas pseudoalcaligens* fueron aisladas de hígado, *Vibrio alginolyticus* de úlceras, hígado, riñón y sangre, *V. vulnificus* de úlceras y branquias, *Vibrio sp.* de úlceras (Tabla 8), mientras que en los peces infectados experimentalmente (ensayo 2 de patogenicidad Pag. 38) *Vibrio alginolyticus* fue aislada del riñón, hígado y estómago, pero no de sangre. Esta característica ha sido reportada también para otros casos de vibriosis en peces y es considerada como criterio para establecer diferencias entre las patologías producidas por las especies de *Vibrio* (Harbell 1976;

Funahashi et al., 1974; Miyazaki & Kubota 1977; Miyazaki et al., 1977). Por un lado, la distribución de las bacterias en los órganos puede ser el reflejo de los factores producidos por un patógeno, con los que sobreviven dentro de un portador y causan enfermedad y por otro lado, muestra el efecto selectivo que las condiciones presentes en los distintos órganos, ejercen sobre las poblaciones bacterianas. Sin embargo, esta distribución no debe ser tomada estrictamente como característica para diagnosticar una enfermedad, ya que dependerá de las condiciones ambientales en las que se desarrolle el proceso infeccioso, el estado de salud del pez y el ~~grado de~~ avance de la infección al momento de hacer los aislamientos (Rodgers & Burke, 1988). Por ejemplo en salmónidos, Ransom *et al.*(1984) encuentra diferencias en la distribución de *Vibrio anguillarum* y *Vibrio ordalii* en sangre, así como en los tejidos que son dañados; y resalta la importancia del grado de avance de la infección en la sucesión de eventos sintomatológicos. Lewis (1985) menciona que al principio de la infección por *Vibrio*, el agente causal se localiza en tejidos específicos principalmente en hígado y riñón y que en la fase septicémica las bacterias pueden ser aisladas de músculo esquelético, piel, branquias, tejido conectivo y tracto digestivo, lo que indica que esta última fase puede depender de factores entre los que incluye las defensas del portador.

Vibrio alginolyticus fue aislada de infecciones de heridas de *P. maculatofasciatus* provocadas durante el manejo. Esta especie ha sido aislada también de lesiones externas en *Mugil curema*, *Mugil liza* (Aguirre et al., 1982) y *Mugil cephalus* (Burke & Rodgers 1981; Rodgers & Burke, 1988).

En los ensayos de sensibilidad a antibióticos *in vitro* se puede observar que los vibrios fueron sensibles a Ceftriaxona (30 mcg), Trimetoprim Sulfametoxazol (25 mcg), Cefotaxima (30 mcg), Netilmicina (30 mcg) y Nitrofurantoina(300 mcg) y resistentes a carbenicilina (100 mcg). De estos antibióticos el único que ha sido reportado para quimioterapia en peces de agua dulce es nitrofurantoína (sodio). Sin embargo, su efectividad en agua marina es baja. En cambio existen otros antibióticos que -han

probado su efectividad en acuicultura para el tratamiento de vibriosis como furazolidone (Noel et al., 1992), halquinol (Austin et al., 1981) y ácido oxolínico (Hustvedt et al., 1992). La selección de un antibiótico para su tratamiento debe ser **evaluada** en cuanto a efectividad y efectos adversos que su uso puede generar, de preferencia debe pensarse en un bactericida de amplio espectro, probado **in vivo** y que actúe rápido para que existan pocas posibilidades de manifestarse resistencia en los patógenos. El ácido oxolínico y difloxacin son de los bactericidas para los que algunas especies de vibrios patógenos (como *V. anguillarum* y *V. Ordalii*), presentan mayor susceptibilidad **in vitro** (Stamm, 1989;). Por las características del ácido oxolínico, representa la alternativa de tratamiento mas viable ya que además ha sido probada en acuicultura y es aceptada en Europa para el tratamiento de algunas enfermedades de peces en cultivo, sin embargo su uso en la cabrilla requiere evaluación por las temperaturas a las que se desarrolla el cultivo.

En el caso de la cabrilla arenera, debido a la ausencia de un patógeno primario durante el desarrollo de la enfermedad, no se puede pensar en la quimioterapia como la mejor medida de prevención y control de esta enfermedad, sino del establecimiento de medidas profilácticas que la eviten.

Como se sabe el uso de antibióticos, a pesar de ser una práctica extendida en los sistemas de cultivo, implica riesgos, como el deterioro del medio ambiente, el surgimiento de cepas resistentes, la inhibición de algunos tipos bacterianos favoreciendo el desarrollo de otros y la interferencia con los sistemas de filtración biológica de los sistemas recirculatorios.

Como se menciono anteriormente, durante el proceso de mantenimiento de la cabrilla, muchas veces se provocan lesiones, en su mayoría de manera involuntaria, las cuales pueden infectarse; en estos casos, o bien cuando se ponen marcas fijas a los peces es posible pensar en el uso de **antibioticos**, aplicados en forma local como medida de terapia para evitar la presencia de infecciones focales, sin embargo su uso

requiere la evaluación de las dosis requeridas así como de su efecto en los peces.

8.4. **Pa togenicidad**

En los ensayos de patogenicidad se pudo observar que ninguna de las cepas tuvo la capacidad de inducir síntomas de enfermedad a peces sanos por vía intraperitoneal en dosis hasta de 5×10^6 bacterias.

Es necesario resaltar que a pesar de que en el ensayo 2, al inocular *V. alginolyticus* vía intraperitoneal, se produjo la muerte de los peces, no existe evidencia contundente de que se pueda considerar patógeno primario, ya que en el ensayo 3 a pesar de haberse incrementado las dosis hasta 1.05×10^8 bacterias la infección no fue reproducida.

A pesar de que en el presente estudio se probaron dosis superiores a las reportadas para inducir una infección experimental con *Vibrio anguillarum* (Levine et al., 1972) y *Vibrio cholerae* (Yamanoi et al., 1980); la enfermedad no se desarrolló. Ello puede indicar por un lado, la ausencia de un patógeno obligado y por otro, la influencia que el manejo de los organismos puede tener en la ocurrencia de infecciones sistémicas.

Al parecer su capacidad para propiciar infecciones en un portador depende de factores externos; los que pueden ser un complejo multifactorial, sin embargo el desarrollo de una condición septicémica puede ser el grado extremo en el que las defensas del pez son debilitadas (Lewis, 1985). Lo cual parece no haber ocurrido en nuestros experimentos de inducción de la enfermedad, ya que en el caso en el que se presenta mortalidad (ensayo 2) no se presentaron síntomas de septicemia, además de no haberse obtenido crecimiento de la bacteria a partir de la sangre.

Los eventos que precedieron la condición septicémica en el lote de reproductores, apoyan las observaciones en relación a que las infecciones por *V.*

alginolyticus se presentan en organismos sometidos a “stress”. Ya que la población en estudio fue un lote de reproductores en los que se presentó infestación de protozoarios; por lo que se sometió a tratamiento prolongado con formol a 0.05 ml/l.

Por un lado se sabe que el proceso de maduración sexual en peces, provoca hiperplasia del tejido interrenal e incremento en los niveles de plasma cortisol, (el cual es uno de los corticosteroides mas importantes en peces), lo que causa disminución en el número de linfocitos y en consecuencia en peces maduros se ha podido observar linfocitopenia; este proceso media una disminución en- los niveles de anticuerpos y un incremento en la susceptibilidad a las enfermedades durante la reproducción (Pickering & Potttienger, 1987 a,b). Por otro lado, la presencia de ectoparásitos, favorece el surgimiento de infecciones bacterianas cuando se produce daño físico en las mucosas de los peces (Rodgers & Burke, 1988). La fase **infectiva** de *Cryptocarium irritans* se alimenta de los tejidos del portador, causando úlceras (Sindermann, 1990). Los tratamientos contra los protozoarios provocan “stress” en los peces infectados, haciéndolos mas susceptibles a infecciones bacterianas (Ling et al., 1993). El uso del formol en baño es un tratamiento general contra protozoarios, ampliamente utilizado en acuicultura y con peces de ornato. Su uso puede tener consecuencias graves: se sabe que la exposición al formol provoca incremento en el hematocrito, glucosa y ácido láctico en sangre, alteraciones en la tasa de respiración, ritmo cardíaco y flujo de **urina** (Kakuta et al., 1991). También causa separación del epitelio, hipertrofia y necrosis branquial (Wedemeyer & Yasutake, 1974; Wedemeyer, 1971) así como degeneración crónica del miocardio (Nilsen et al., 1992).

A pesar de que la reproducción generalmente se considera un síntoma de salud, el gasto energético realizado por los reproductores durante el desove es alto (Wootton, 1985), por ello requieren de un régimen alimenticio que les ayude a soportar ese desgaste. Si la alimentación es de mala calidad, lo mas seguro es que se propicien deficiencias nutricionales, las cuales muchas veces se manifiestan como una

mayor susceptibilidad a las enfermedades (Watanabe, 1985; Hardie et al., 1990; Obach & Laurencin, 1992).

Lo anterior hace patente la necesidad de implementar medidas profilácticas que eviten la aparición de enfermedades como la vibriosis: cuidando la calidad del agua y con buen régimen alimenticio durante la reproducción, el cual incluya estimuladores del sistema inmune durante el tiempo de desoves. Ya que como se ha visto, la dieta influye de manera directa en la respuesta inmune del pez, además de existir compuestos que pueden favorecer la resistencia a las enfermedades cuando son agregados a la dieta (Hardie et al., 1990; Obach & Laurencin, 1992).

V. alginolyticus es causa de la mortalidad de juveniles de *Acanthopagrus schlegeli* (Kusuda et al., 1986) y del desarrollo de patologías en *Coryphaena hippurus* (LeaMaster, 1988), *Sparus aurata* (Colorni et al., 1981) y *Canthigaster rosfrata* (Ventura & Albuquerque, 1983); sin embargo, en ninguno de esos casos se pudo reproducir la infección

En los casos en que *V. alginolyticus* se ha asociado a procesos infecciosos, su capacidad de producir lesiones es atribuida a la presencia de factores externos que hacen posible la infección, por lo que su diagnóstico puede ser un indicador de alteración al medio ambiente o de la presencia de procesos que causan “stress” en las poblaciones o lotes de peces mantenidos en cautiverio.

En base a lo anterior se sugiere un posible mecanismo para el proceso infeccioso de *V. alginolyticus* el cual se pudo desarrollar en 3 etapas: 1) En la que se encuentra presente en el agua y pasa a formar parte de la microflora normal del pez, 2) en la que por alguna erosión causada a la mucosa del pez puede colonizarla y producir una infección focal, ya sea como invasor primario o bien relacionándose a otro patógeno oportunista y 3) en la que debido a factores externos o internos (ambientales o fisiológicos) las defensas del portador disminuyen y el patógeno puede invadir otros tejidos, evolucionando en una infección sistémica cuya sintomatología es

característica de una septicemia hemorrágica bacteriana (Fig. 5).

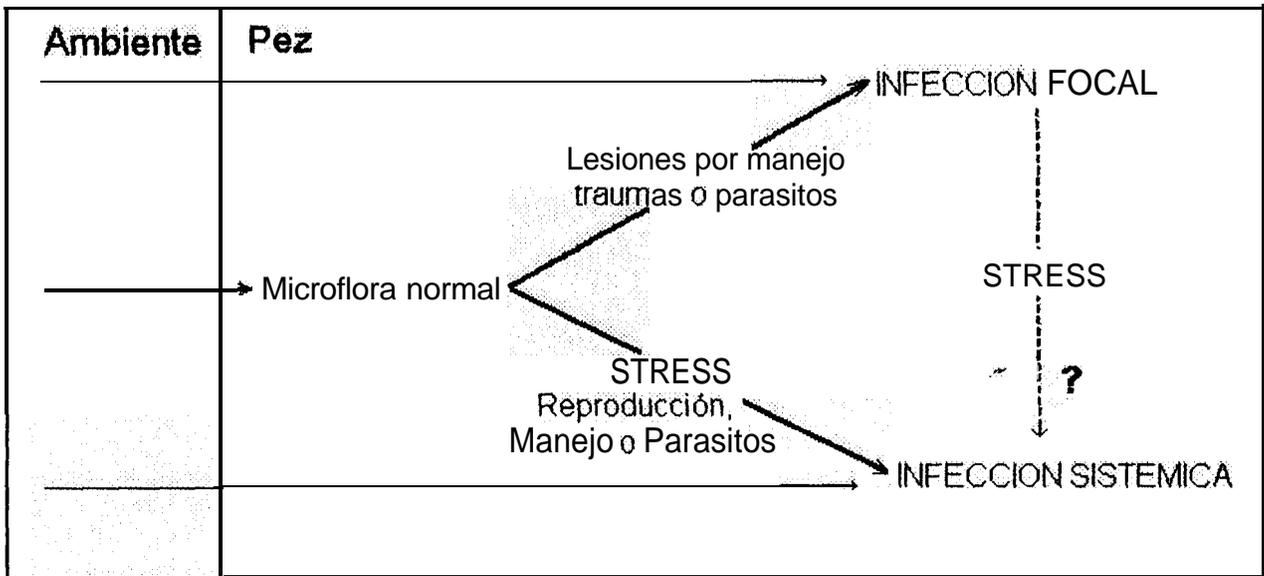


Figura 5.- Proceso infeccioso de *V. alginolyticus*

Hasta ahora las condiciones precisas bajo las que *V. alginolyticus* es capaz de producir una infección en la cabrilla arenera son inciertas, pero de manera general siempre ha sido asociada a peces bajo “stress” ya sea por manejo, por presencia de condiciones ambientales adversas o por la presencia de ectoparásitos. Condiciones que parecen explicar los resultados negativos de las infecciones con esta bacteria sobre la cabrilla del estudio.

8.5. Parámetros sanguíneos.

En la evaluación de leucocitos, se observan diferencias significativas entre peces sanos y enfermos. En peces sanos las células más abundantes fueron trombocitos con 47.2 %, seguido de linfocitos con 41.4 %, granulocitos 7.85 % y monocitos y macrófagos 3.6 %. En cambio en peces enfermos, el porcentaje más alto corresponde a los monocitos y macrófagos con 70.4 %, linfocitos 24.8 %, trombocitos 2.6 % y granulocitos 2.2 %.

De manera general en cabrillas enfermas se observa un menor porcentaje de linfocitos, granulocitos y trombocitos así como un mayor porcentaje de monocitos y macrófagos.

Estas diferencias entre organismos sanos y enfermos son semejantes a las reportadas en otros peces. Lehmann et al.(1989) durante la infección experimental con *Aeromonas salmonicida* en trucha arco iris, encuentran aumento de monocitos y neutrófilos y disminución de linfocitos y trombocitos. En *Ictalurus punctatus* Lewis (1985) encuentra una disminución significativa de linfocitos (del 72% al 68 %) así como aumento del porcentaje de monocitos (del 1% al 3%). Ransom et al. (1984) en salmónidos, observan un decremento en el contenido de células blancas, lo cual correlacionan con la presencia de bacterias en sangre y atribuyen a la posible presencia de leucocidina, un factor de virulencia de vibrios.

A pesar de haberse determinado diferencias significativas en los porcentajes de células blancas entre peces sanos y enfermos, estos resultados solo pueden interpretarse como un estado anormal del tejido sanguíneo ante la presencia de bacterias. Los bajos porcentajes de linfocitos, granulocitos y trombocitos no sugieren una leucopenia, ya que para diagnosticar ese estado se necesita evaluar el total de células por unidad de volumen.

Estas desviaciones de la normalidad pueden ser interpretadas como parte de la respuesta inmune de las cabrillas ante la invasión bacteriana, así como el efecto que factores extracelulares bacterianos como toxinas o enzimas (Inamura et al., 1985; Notage & Birkbeck, 1987a,b); pueden ejercer sobre las células sanguíneas al encontrarse éstas en sangre, sin embargo, para establecer las causas y el significado preciso de estas diferencias es necesario estudiar con mayor detenimiento los cambios patológicos ocurridos ante la invasión bacteriana.

A diferencia de lo reportado por Bhaskar & Srinivasa (1989) que reportan distribución no gaussiana en los parámetros hematológicos de *Chanos chanos*; en la

cabrilla arenera se encontró que los porcentajes de leucocitos están normalmente distribuidos. Ello es de importancia cuando se establecen los intervalos de tolerancia para los parámetros sanguíneos con el fin de poder diagnosticar estados anormales causados por algún agente externo; ya que el uso de un intervalo de tolerancia cuyos límites sean estimados considerando la teoría gaussiana es inexacto cuando la población no presenta distribución normal. Sin embargo, estos resultados no sugieren que todos los parámetros sanguíneos en sangre de cabrilla estén normalmente distribuidos y por ello es recomendable que si en algún momento se quieren usar los parámetros sanguíneos para evaluar el estado de salud, primero se determinen si cada parámetro está normalmente distribuido.

9. CONCLUSIONES

9.1. Características de la enfermedad

Los organismos afectados se observan inactivos y torpes, se presenta anorexia y aumento del ritmo respiratorio. Externamente hay oscurecimiento de la piel, pérdida y levantamiento de escamas, hemorragias y ulceración en la piel: principalmente en la región pélvica y en opérculos, la cola y las aletas presentan hemorragias severas y erosión. Se observa opacidad de ojos, acumulación de mucus y en algunos peces erosión de la línea lateral. Internamente se observan hemorragias sobre la vejiga gaseosa e intestinos, el intestino se encuentra lleno de una sustancia líquida transparente especialmente hacia la región rectal y el hígado se observa decolorado.

Los síntomas se ajustan a las descripciones en casos de vibriosis en peces marinos y de agua dulce, tales como *Anguilla anguilla*, *Coryphaena hippurus*, *Mugil cephalus*, *Sparus aurata*, *Ictalurus punctatus* y en salmónidos.

En peces moribundos se observan cambios en los porcentajes de leucocitos: Disminución en Trombocitos, Linfocitos y Granulocitos y aumento en Monocitos y Macrófagos.

9.2. Aislamiento del patógeno

Las bacterias asociadas a la infección se pueden aislar con los medios TCBS y TSA (con salinidad normal y ajustando la salinidad a 25 ‰ con sal marina); de úlceras, hígado, riñón y sangre con incubación a 25 y 35 °C aunque poseen la capacidad de crecer hasta 42°C.

Las especies bacterianas relacionadas a lesiones y órganos de peces enfermos fueron: *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Vibrio alginolyticus*, *V. vulnificus* y *Vibrio* sp. Las que se aislaron diferencialmente en los tejidos del portador, *Acinetobacter* sp. y *Pseudomonas pseudoalcaligenes* fueron aisladas de hígado, *Vibrio alginolyticus* de úlceras, hígado, riñón y sangre, *V. vulnificus* de úlceras y branquias,

Vibrio sp. de úlceras.

La especie aislada más frecuentemente fue *Vibrio alginolyticus*, la cual también fue aislada de infecciones focales.

9.3. Patogenicidad

Ninguna de las cepas aisladas fue capaz de producir daños clínicos en peces sanos, cuando se inyectó vía intraperitoneal en dosis de hasta 5×10^6 bacterias. Por lo que la condición patológica mostrada por el lote de reproductores se atribuye a factores de “stress”, como exceso de manejo, mala calidad del alimento y sobre exposición al formol; no así a la calidad del agua ya que esta se mantuvo dentro de límites recomendables para peces mantenidos en cautiverio (ver tabla 11; pag 86).

9.4. Control

Debido a la ausencia de un patógeno obligado en la condición hemorrágica de la cabrilla, el uso de antibióticos o bien el desarrollo de vacunas como medidas de control no se pueden sugerir, sin embargo, debido a que *V. alginolyticus* fue aislada también de infecciones focales de heridas hechas durante su manipulación, el uso de antibióticos puede resultar una medida útil para evitar la proliferación de dichas bacterias. Las heridas pueden ser tratadas a tiempo con antibióticos o antisépticos aplicados de manera local. Las cepas aisladas del género *Vibrio* fueron sensibles a Ceftriaxona, Trimetoprim Sulfametoxazol, Cefotaxima, Netilmicina y Nitrofurantoina (Tabla 12) sin embargo su uso requiere de evaluación.

10. RECOMENDACIONES

Para dar un seguimiento de la ocurrencia de las enfermedades de la cabrilla arenera, se recomienda a los laboratorios donde se estudia la factibilidad de su cultivo, adoptar la **bitacora** de compilación de datos propuesta por Ishioka en 1992. Ello es de gran importancia para identificar las enfermedades que por su incidencia pueden limitar el cultivo de dicha especie.

Para el estudio de bacterias patógenas de peces, los medios-TSA-2.5, TCBS y el medio de **ZoBell** modificado (Medio marino); funcionan eficientemente. Por el contrario se recomienda descartar el medio EMB, ya que no proporciona buenos resultados en el aislamiento.

El uso de sal marina comercial como opción alternativa a preparar agua de mar con reactivos analíticos es muy recomendable ya que facilita la preparación de los medios de cultivo, sin embargo su uso solo puede recomendarse para el aislamiento y manutención de las cepas no así para pruebas cuantitativas en las que es mas recomendable ejercer control de los componentes que contiene el medio.

Para la identificación de bacterias patógenas el uso de los sistemas de multipruebas **API** en la mayor parte de los casos resulta eficiente, sin embargo se recomienda no descartar el uso de pruebas bioquímicas complementarias ya que como se puede ver en el presente trabajo, algunas veces dichos sistemas de multipruebas no **condúcen** a ninguna identificación confiable.

Con respecto a la evaluación de células sanguíneas se recomienda que para estudios posteriores se contemple la implementación de técnicas para evaluar el hematocrito, eritrocitos totales, leucocitos totales, hemoglobina y calcio, ya que el conocer esos parámetros las conclusiones a las que se puede llegar van mas allá de la interpretación de un estado fisiológico adverso, sobre todo si son complementados con el estudio histológico de los tejidos dañados.

El uso de quimioterapia para contrarrestar el efecto de un patógeno cuando este se manifiesta como un estado patológico, conlleva riesgos tanto de manejo de los peces como de deterioración del ambiente, por ello en este sentido no es posible sugerir un método para detener la infección, sin embargo es recomendable evaluar los compuestos terapéuticos que han funcionado con otros peces en cultivo.

Debido a que en el presente trabajo no se hace evidente la presencia de patógenos obligados, se recomienda implementar medidas profilácticas para evitar la aparición de enfermedades, cuidando aquellos aspectos que se han visto propician mayor susceptibilidad a los patógenos oportunistas; **tales** como:

a) Establecer un régimen alimenticio basado en los requerimientos de los reproductores, ya que debido a su frecuencia de desove las alteraciones que se pueden ocasionar por una alimentación deficiente pueden ser mayores que en otras especies en las que el desove se presenta como un solo evento anual o con una menor frecuencia. Y evitar alimentar con peces recién capturados, ya que se pueden estar introduciendo muchas bacterias y parásitos a un sistema en el que se puede favorecer su proliferación, para evitarlo, se recomienda que cuando menos el pescado que vaya a ser utilizado como alimento haya pasado una semana de congelación.

b) Se recomienda llevar un control estricto de los compuestos aplicados a los peces, estableciendo dosis y tiempos de aplicación específicos.

c) Se recomienda llevar el registro y control estricto de la calidad del agua, **mortalidades** y síntomas desarrollados durante el mantenimiento de peces. Con ello muchas veces se pueden inferir las causas de las pérdidas así como determinar frecuencia de aparición y temporalidad de algunas enfermedades.

Debido a la necesidad de conocer las alteraciones que las enfermedades pueden ocasionar en peces cultivados tanto comercialmente como en fase de experimentación se recomienda profundizar en el conocimiento de las enfermedades desarrolladas durante el mantenimiento de los peces, ya que en la medida que se

aborde este aspecto, se podrán evitar posibles disturbios y retraso de los resultados experimentales así como pérdidas económicas. Por lo que se recomienda:

a) Implementar técnicas de identificación como el uso de anticuerpos para establecer diagnósticos rápidos.

b) Establecer métodos que permitan evaluar el estado de salud del pez, estos pueden hacerse con análisis de sangre o mediante la evaluación de la producción de anticuerpos, esto es, mediante ensayos de la respuesta inmuno-específica como aglutinación o hemaglutinación pasiva.

c) Particularmente en el caso de desovadores parciales como la cabrilla, estudiar el efecto que tiene la reproducción continua sobre el sistema inmune y si existe forma de contrarrestar efectos adversos.

d) Estudiar factores de la dieta (v.gr. vitaminas y minerales) que intervienen y favorecen la respuesta inmune de las cabrillas, los cuales podrían ser proporcionados de manera mas directa a los reproductores.

II. LITERATURA CITADA

- Aguirre, M., Caroli, A.B. & Conroy, D.A. , 1982. Studies on the health status of mullets from the east of Venezuela. *Riv. Ital. Piscic. Ittiopatol*, 47(4): 176-180.
- Akazawa, H., 1968. Bacteria1 disease of marine fishes. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 34: 271-272.
- Alexandra, A., 1991. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* biotype alginolyticus in penaeid shrimps using an amplified enzyme-linked immunosorbent assay. *Aquaculture*, 93: 101-108.
- Allen, D.A., Austin B. & Colwell, R.R., 1983. Numerical taxonomy of bacteria1 isolates associated with a freshwater fishery. *Journal of General Microbiology*, 129:2043-2062.
- Anderson, J. I.W. & Conroy, D.A., 1970. *Vibrio* disease in marine fishes. *In*: Snieszko, S.F (Editor), 1970. *A Symposium on Diseases of Fishes and Shellfishes. Special publication No. 5, American Fisheries Society. Washington*, pp. 226-272.
- Anguas, V.B., 1992. Biología y cultivo experimental de peces marinos de importancia comercial, Informe Técnico Enero-Junio 1992, CICIMAR I.P.N., 35 pp.
- Anguas, V.B., 1993. Sistema para el cultivo piloto de peces marinos de importancia comercial. Informe Técnico Final 1993, CICIMAR I.P.N., 54 pp
- Anguas V.B., Martínez P.R., González A.B., Almenara R. S. & Rodríguez M.O., 1991. Sistema para el acondicionamiento e inducción al desove de peces marinos. II Congreso Nac. de Ictiología, San Nicolas de los Garza, N.L.México, 3-1.
- Austin, B., 1982. Taxonomy of bacteria isolated from a coastal, marine fish rearing unit. *Journal of applied Bacteriology*, 53: 253-268.

- Austin, B., 1983. Bacteria1 micloflora associated with a coastal, marine fish rearing unit. *Journal of the Marine Biological Association* , UK, 63: 583-592.
- Austin, B., 1988. *Methods in aquatic bacteriology*. John Wiley & Sons, UK, 425 pp.
- Austin, B. & Austin, D.A., 1987. Bacteria1 fish pathogens: Disease in farmed and wild fish. Ellis Horwood; Chichester (UK), Ellis Horwood Books Aquacult. Fish Suport., 364 pp.
- Austin, B. & Morgan, D.A. & Aldeman, D.J., 1981. Comparison of antimicrobial agents for control of vibriosis in marine fish. *Aquaculture*, 26:1-2.
- Baudin-Laurencin, F., 1987. Pathogenicity of vibriosis: An example of relationships between pathogenic organism, host and environment. Ten years research in aquaculture. Part 1: Fish.); Dix ans de recherche en aquaculture. 1. Partie: les poissons. *Oceanis*, 13(1): 115-1 23.
- Baumann, P., Brenner D. J., Farmer, J.J., Frederiksen W. & Shewan, J.M., 1984. Vibrionaceae and other Gram negative Facultatively Aerobic Rods. *In*:Krieg N.R. & Holt J.G. (Eds.), 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 125-1 39.
- Bhaskar, B.R & Srinivasa, R., 1989. Influence of environmental variables on haematology and compendium of normal haematological ranges of milkfish *Chanos chanos* (Forsk.) in brakishwater culture. *Aquaculture*, 83: 123-136.
- Biosca, E.G., Amaro, C., Esteve, C., Alcaide E. & Garay, E., 1991. First record of *Vibrio vulnificus* Biotype 2 from diseased European eel, *Anguilla anguilla* L.. *Journal of Fish Diseases*, 14:103-109.
- Bruun, A.F. & Heiberg, B., 1935. Weitere untersuchungen über die rotseuche des aales in den dänischen Gewässern. *Zeitschrift für Fischerei und deren Hilfwissenschaften*, 33: 379-381.

- Burke, J. & Rodgers, L., 1981. Identification of pathogenic bacteria associated with the occurrence of 'red spot' in sea mullet, *Mugil cephalus* L. in South-Eastern Queensland. *Journal of Fish Diseases*, 3: 153-159.
- Carpenter, P.L., 1977. *Microbiology*. 4th Edition. Ed. Saunders, USA, 750 pp.
- Cisar, J.O. & Fryer, J.L., 1969. An epizootic of vibriosis in Chinook salmon (*Oncorhynchus fshawytscha*). *Bulletin of the wildlife Disease Association*, 5 pp.
- Colorni, A., Paperna I. & Gordin, H., 1981. Bacterial infections in gilt-head sea bream *Sparus aurata* cultured at Elat. *Aquaculture*, 23:257-267.
- Colwell, R.R., 1984. *Vibrios in the Marine Environment*. Wiley, N.Y., 634 pp.
- Conroy, D.A., 1984. Agents: Bacteria. In: O. Kinne (ed.), *Diseases of Marine Animals I*, 4, *Biol. Asalt Helgol.*, Hamburg, R.F.A., pp. 48-88.
- Crosa, J. H., Schiewe M.H. & Falkow, S., 1977. Evidence for plasmid contribution to the virulence of the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infection and Immunity*, 18:503-513.
- Frerichs, G.N., 1984. The isolation of fish bacterial pathogens. *Inst. of Aquaculture Univ. of Sterling, Scotland*, pp. 4-5.
- Fryer, J.L., Nelson, J.S. & Garrison, R.L., 1972. Vibriosis in fish. *Progress in Fishery and food Science*, 5: 129-133.
- Funahashi, N., Miyazaki, T., Kodera K. & Kubota S., 1974. Histopathological studies of vibriosis of ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Fish pathology*, 8: 136-143.
- Gallardo, R.R., Rodriguez, P.M.C. & Vargas, T.P.A., 1992. Manual de técnicas y procedimientos para la investigación de *Vibrio cholerae* en agua y alimentos. *Secretaria de salud, Lab. Nac. de Salud Publ, México*, pp 33.
- Ghittino, P. & Andruetto, S., 1977. Fish vibriosis in fresh and salt waters of Italy. *Bulletin de l'Office International des Epizooties*, 87: 483-485.

- Gillespie, N.C. & Macrae, I.C., 1975. The bacteria¹ flora of some Queensland fish and its ability to cause spoilage. *Journal of Applied Bacteriology*, 39: 91-100.
- Gromon, D.B., 1982. Histology of the striped bass. American Fisheries Society. Monograph. No. 3, Maryland, 116 pp.
- Hansen, H.C. & Bonde, G.J., 1973. *Aeromonas hydrophila* (*P. iquefaciens*) som mulig årsag til furunkulose hos al. Nord Veterinaermed, 25:121-130 (Resumen en ingles).
- Harbell, S.C., 1976. The pathology of vibriosis in coho salmon. Tesis de maestria, Universidad de Washington, Seattle, USA.
- Hardie, L. J., Fletcher T.C. & Secombes, C. J., 1990. The effect of vitamin E on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 87: 1-13.
- Håstein, T. & Lindstad, T., 1991. Diseases in wild and cultured salmon: Possible interactions. *Aquaculture*, 98: 277-288.
- Hawke, J.P., Plakas, S.M., Minton, R.V., McPhearson, R.M., Snider T.G. & Guarino, A.M., 1987. Fish pasteurellosis of cultured striped bass (*Morone saxatilis*) in coastal Alabama. *Aquaculture*, 65: 193-204.
- Hawke, J.P., 1976. A survey of the diseases of striped bass, *Morone saxatilis*, and Pompano *Trachinotus carolinus*, cultured in earthen ponds. Proc. Annu. Meet., World Maric. Soc., 495-509.
- Hendrie, M. S. & Shewan, J.M., 1979. The identification of Pseudomonads. In: Skimer, F.A. & Lovelock, D.W., 1979. Identification methods for microbiologist. Academic Press, London, pp. 1-14.
- Hofer, B., 1904. Handbuch der fischkrankheiten. Verlag Allgem. Fischerei Ztg., Munich. R.F.A., 335 pp.

- Horne, M.T., Ritchards, R.H., Roberts R.J. & Smith, P.C., 1977. Peracute vibriosis in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*. J. Fish Biol., 11: 355-361.
- Horsley, R. W., 1973. The bacterial flora of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L), in relation to its environment. Journal of Applied Bacteriology, 36: 377-386.
- Houston, A. H., 1990. Blood and Circulation. In: Schrec, C.B. & Moyle, P.B. (Ed), 1990. Methods for fish Biology. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, pp. 273-322.
- Hustvedt, S.O., Salte R. & Vassvik, V., 1992. Combatting cold water vibriosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with oxolinic acid: a case report. Aquaculture, 103: 213-219.
- Inamura, H., Nakai T. & Muroga, K., 1985. An extracellular proteinase produced by *Vibrio anguillarum*. Bull. of the Jap. Soc of Sci. Fisheries, 51: 1915-1920.
- Ishioka, H., 1992. Epidemiology of marine fish diseases in the warm waters along the Kuroshio current. In: Svrjcek, R.S. (ed), 1992. Control of disease in aquaculture, NOAA Technical Report NMFS II 1. US Department of Commerce, pp. 69-85.
- Jensen, N.J., Larsen, J.L. & Christensen, N.O., 1983. Spring ulcer disease in eel (*Anguilla anguilla*). Rapp. P.-V. Reun., Cons. Int. Explor. Mer., 182: 106-110.
- Jimenez, G.F., Galviz, S.L., Segovia, S.F., Garza F.H. & Wesche, E.P., 1986. Parasitos y Enfermedades del Bagre, 2^a Edicion. FONDEPESCA, 135 pp.
- Kakuta, I., Namba, K., Uematsu K. & Murachi, S., 1991. Physiological response of the fish, *Ciprinus carpio*, to formalin exposure. 1. Effect of formalin on urine flow, heart rate, respiration. Comp. Biochem. Physiol., 100c(3):405-411.
- Kusuda, R, Yokoyama J. & Kawai, K., 1986. Bacteriological study on cause of mass mortalities in cultured black sea bream fry. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish./Nisuiishi., 52(10): 1745-1751.

- LeaMaster, B.R. & Ostrowski, A.C., 1988. Vibriosis in captive dolphins. *The Progressive Fish Culturist*, 50: 251-254.
- Lee, J.V., Shread, P., Furniss A.L. & Bryant, T.N., 1981. Taxonomy and description of *Vibrio fluvialis* sp. nov. (synonym group F vibrios, group EF6). *J. Appl. Bacteriol.*, 50: 73-94.
- Lehmann, J., Stuerenberg F.J. & Mock, D., 1989. Changes in the haemogram of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) following an experimental infection with a strain of *Aeromonas salmonicida salmonicida*. *Fish Health Protection Strategies*, pp. 259-284.
- Levine, M.A., Wolke, R.E. & Cabelli, V.J., 1972. *Vibrio anguillarum* a cause of disease in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Canadian Journal of Microbiology*, 18: 1585-1 589.
- Lewis, D.H., 1981. Immunoenzyme microscopy for differentiating among systemic bacterial pathogens of fish. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 38:463-466.
- Lewis, D.H., 1985. Vibriosis in Channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Journal of Fish Diseases*, 8:539-545.
- Ling, K.H., Sin, Y.M. & Lam, T.J., 1993. Protection on goldfish against some common ectoparasitic protozoans, using *Ichthyophthirius multifiliis* & *Tetrahymena pyriformis* for vaccination. *Aquaculture*, 116:297-386.
- Mac-Fadin, J.F., 1980. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. **Medic.** Panamericana, Argentina, 301 pp.
- Mayer, B.K. & Ward, D.R., 1991. Microbiology of finfish and finfish processing, In: Ward, D.R. & Hackney C.R., (ed). *Microbiology of marine food products*, AVI, U.S.A, 340 pp.

- Mialhe, D., Boulo, V., Hervio, D., Cousin, K., Noel, T., Ohresser, M., le Deuff, R.M., Despres B. & Gendreau, S., 1992. Development of new methodologies for diagnosis of infection diseases in mollusc and shrimp aquaculture. *Aquaculture*, 107:155-164.
- Miller, D.A. & Lea, R.N., 1972. **Guide to the coastal marine fishes** of California. Calif. Dept. Fish Game, Fish Bull., 95 pp.
- Miyazaki, T. & Egusa, S., 1977. Histopathological studies of **red spot disease of the Japanese eel (*Anguilla japonica*)**. I. Natural infection. *Gyobyu kenkyu*, 12: 39-49.
- Miyazaki, T., Yashuhiko, J., Kubota, S.S. & Egusa, S., 1977. Histopathological studies on vibriosis of the Japanese eel (*Anguilla japonica*)-I. Natural infection. *Fish Pathology*, 12: 163-170.
- Miyazaki, T. & Kubota, S.S., 1977. Histopathological studies on vibriosis of the salmonids. *Fish Pathology*, 12: 93-98.
- Mqolomba, T.N. & Plumb, J.A., 1992. Longevity of *Edwardsiella ictaluri* in the organs of experimentally infected channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, 101:1-6.
- Muroga, K., 1975. Studies on Vibrio *anguillarum* and *V. anguillicida* infections. *Journal of the faculty of Fisheries and Animal Husbandry, Hiroshima University*, 14: 101-205.
- Muroga, K., 1978. Red spot disease of eels. *Gyobyu kenkyu*, 13: 35-39.
- Muroga, K., Jo Y. & Yano, M., 1973. Studies on red spot disease of pond-cultured eels. I. The occurrence of the disease in eel culture ponds in Tokushima Prefecture in 1972. *Gyobyu Kenkyu*, 8:9-24.
- Muroga, K., Jo Y. & Sawada, T., 1975. Studies on red spot disease of pond-cultured eels. II. Pathogenicity of the causative bacterium, *Pseudomonas anguilliseptica*. *Gyobyu kenkyu*, 9: 107-114.

- Muroga, K., Jo Y. & Nishibushi, M., 1976a. Pathogenic *Vibrio* isolated from cultured eels. 1. Characteristics and taxonomic status. *Fish Pathology*, 12: 141-145.
- Muroga, K., Nishibushi, M. & Jo, Y., 1976b. Pathogenic *Vibrio* isolated from cultured eels. II. Physiological characteristics and pathogenicity. *Fish Pathology*, 11: 147-151.
- Muroga, K., Nakai T. & Sawada, T., 1977a. Studies on red spot disease of pond-cultured eels. IV., Physiological characteristics of the causative bacterium, *Pseudomonas anguilliseptica*. *Gyobyō kenkyū*, 12: 33-38.
- Muroga, K., Sugiyama, T. & Ueki, N., 1977b. Pasteurellosis in cultured black sea bream (*Mylio macrocephalus*). *Hiroshima Daigaku Suichikūgakubu Kiyō*, 16: 17-21.
- Muroga, K., Higashi M. & Keitoku, H., 1987. The isolation of intestinal microflora of farmed Seabream (*Pagrus major*) and black Seabream (*Acanthopagrus shlegeli*) at larval and juvenile stages. *Aquaculture*, 65: 79-88.
- Nieto, T.P., Toranzo A.E. & Barja, J.L., 1984. Comparison between the bacterial flora associated with fingerling rainbow trout cultured in two different hatcheries in the North-West of Spain. *Aquaculture*, 42: 193-206.
- Nilsen, H., Lillehaug, A., Taksdal T. & Nordmo, R., 1992. Toxicity of intraperitoneally injected formalin in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.. *J. of Fish Dis.*, 15(4):323-330.
- Noel, T., Aubree, E., Mialhe E. & Grizel, H., 1992. Treatments against the *Vibrio* P1, suspected to be responsible for mortalities in *Tapes philippinarum*. *Aquaculture*, 107: 171.
- Notage, A. S. & Birkbeck, T.H., 1987a. Purification of a proteinase produced by the bivalve pathogen *Vibrio alginolyticus* NCMB 1339. *J. of Fish Dis.*, 10: 211-220.

- Notage, A.S. & Birkbeck, T.H., 1987b. Production of proteinase during experimental infection of *Ostrea edulis* L. larvae with *Vibrio alginolyticus* NCMB 1339 and the antigenic relationship between proteinase produced by marine vibrios pathogenic for fish and shellfish. *J. of Fish Diseases*, 10: 265-273.
- Oda, D.L., Lavenberg, R.J., & Rounds, J.M., 1992. Reproductive biology of three California species of *Paralabrax* (Pisces:Serranidae). *CalCOFI Rep.*, 34: 122-132.
- Obach, A. & Laurencin, B., 1992. Effect of dietary oxidized fish oil and deficiency of antioxidants on the immune response of turbot *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture*, 107: 221-228.
- Paterson, W.D., Gallant, C. & Desautels, D., 1979. Detection of Bacteria1 Kidney disease in wild salmonids in the Margaree River System and adjacent waters using an indirect fluorescent antibody technique. *J. Fish. Res. board Can.*, 36: 1464-1 469.
- Pelczar, M.J., Reid, R.D. & Chan, E.C.S., 1982. *Microbiología*, Segunda edición. McGraw-Hill, México, 826 pp.
- Pickering, A.D. & Pottinger, T.G., 1987a. Lymphocytopenia and interrenal activity during sexual maturation in the brown trout *Salmo trutta* L.. *J. Fish Biol.*, 30: 41-50.
- Pickering, A.D. & Pottinger, T.G., 1987b. Crowding causes prolonged leucopenia in salmonid fish, despite interrenal acclimation. *J. Fish Biol.*, 30:701-712.
- Post, G., 1987. *Textbook of fish health*. T.F.H. publ., U.S.A., 420 pp.
- Ransom, D.P., Lannan, C.N., Rohovec, J.S. & Fryer, J.L., 1984. Comparison of histopathology caused by *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii* in three species of Pacific salmon. *Journal of fish diseases*, 7: 107-1 15.
- Roberts, R.J., 1978. *Patología de los peces*, Versión española de Blanco, C.M.C.(Ed), 1981. Ed Mundi-Prensa, Madrid, 365 pp.

- Rodgers, L.J. & Burke, J.B., 1988. Seasonal variation in the prevalence of "red spot" disease in estuarine fish with particular reference to the sea mullet, *Mugil cephalus* L.. Journal of fish Diseases, 4: 197-307.
- Rosales, V. M., Martínez, P.R., Anguas, V.B., Contreras, O.M. & Rodriguez, M. E., 1992. Inducción al desove de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner) (Pisces:Serranidae) mantenida en laboratorio. III Congreso Nacional de Ictilogía, 24-27 Nov, Oaxtepec, México, pp. 18.
- Sakai, M., Soliman, M.K., Yoshida, T. & Kobayashi, 1993. Identification of pathogenic fish bacteria using the API-ZYM system. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 50:1137-1141.
- Sakata, T., Okabayashi, J. & Kakimoto, D., 1978. Microfora in the digestive tract of marine fish. 1. General characterization of the isolates from yellowtail. Memoirs of the Faculty of Fisheries of Kagoshima University, 27: 65-71.
- Sanders, J.E. & Fryer, J.L., 1988. Bacteria of fish, In: Austin B., (Ed), 1988. Methods in Aquatic Bacteriology. John Wiley & Sons Ltd., pp. 115-142.
- Santos, Y., Romalde, J.L., Bandin, I., Magariños, B., Nuñez, S., Barja, J.L. & Toranzo, A.E., 1993. Usefulness of the API-20E system for the identification of bacterial fish pathogens. Aquaculture, 116: 11-20.
- Schaperclaus, W., 1930. *Pseudomonas punctata* als Krankheitserreger bei Fischen. Z. Fisch., 28: 289-370 (Resumen en ingles).
- Schiewe, M.H., Trust, T.J. & Crosa, J.H., 1981. *Vibrio Ordalii* sp nov.: a causative agent of vibriosis in fish. Current Microbiology, 6: 743-748.
- Schmidt, U., Chmel, H. & Cobbs, C., 1979. *Vibrio alginolyticus* infections in humans. J. Clin. Microbiol., 10: 666-668.
- Shotts, E. B. & Bullock, G.L., 1975. Bacterial diseases of fishes; diagnostic procedures for Gram negative pathogens. J. Fish Res. Board Can., 32: 1243-1247.

- Siebert, J.M., 1979. *Sea Microbes*. Oxford. University Press, 690 pp.
- Sindermann, C.J., 1990. Principal diseases of marine fish and shellfish, Vol.1, Segunda edición. Academic Press, U.S.A., 521 pp.
- Smith, P.D., 1988. Vaccination against Vibriosis, *In: Ellis A.E.(Ed.)*, 1988. Fish Vaccination. Academic Press, USA, 255 pp.
- Snieszko, S.F., Bullock, G.L., Hollis E. & Boone, J.G., 1964a. *Pasteurella sp.* from an epizootic of white perch (*Roccus americanus*) in Chesapeake Bay tidewater areas. *J. Bacteriol.*, 88: 1814-1815.
- Snieszko, S.F., Bullock, G.L., Dunbar, C.E. & Pettijohn, L.L., 1964b. Nocardial infection in hatchery-reared fingerling rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Bacteriol.*, 88:2809-2810.
- Stamm, J.M., 1989. In vitro resistance by fish pathogens to aquacultural antibacterials including the quinolones difloxacin (A-56619) and sarafloxacin (A-56620). *J. of Aquatic Animal Health*, 1:135-141.
- Stickney, R.R. & Kohler, C.C., 1990. Maintaining fishes for research and teaching. *In: Schrech, C.B. & Moyle, P.B., (Ed)*, 1990. Methods for fish Biology, Amer. Fish. Soc., USA, pp., 633-661.
- Thompson, D.A., Findley L.T. & Kerstich, A.N., 1979. Reef fishes of the Sea of Cortez, John Wiley & Son, N.Y.
- Trust, T.J., 1975. Bacteria associated with the gills of salmonid fishes in freshwater. *Journal of Applied Bacteriology*, 38: 225-233.
- Trust, T.J. & Sparrow, R.A.H., 1974. The bacterial flora in the alimentary tract of freshwater salmonid fish. *Canadian Journal of Microbiology*, 20: 1219-1228.

- Ventura, M.T. & Albuquerque, M.T.F., 1983. Vibriosis in *Canthigaster rostrata* Bloch 1786 in Portugal, a case report. *Repos. Trab. Inst. Nac. Vet. Portugal*, 145: 123-128.
- Vivares, C.P. & Guesdon, J.L., 1992. Nucleic acid probes in aquatic bacteriology. *Aquaculture*, 107: 147-154.
- Ward, D.R. & Cameron, H., 1991. Microbiology of marine food products. Van Nostrand Reinhold, N.Y., 450 pp.
- Watanabe, T., 1985. Importance of study of broodstock nutrition for further development of aquaculture. In: Cowey C.B. & Mackie A.M. y Bell J.G., (Eds). Nutrition and feeding in fish. Academic Press, London, pp. 395-415.
- Wedemeyer, G. & Yasutake, W.T., 1974. Stress of formalin treatment in juvenile spring chinook salmon (*Oncorhynchus fsawyfscha*), and steelhead trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 31:179-184.
- Wedemeyer, G., 1971. The stress of formalin treatments in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 28: 1899-1904.
- Wootton, R.J., 1985. Energetics of reproduction, 231-256 In: Tyler, P., (Ed), 1985. Fish energetics new perspectives. Johns Hopkins, U.K., 349 pp.
- Worren, J.W., 1983. The nature of fish diseases, In: Meyer, F.P., Worren J.W. & Corey, T.G., (Eds.), A guide to integrated Fish Health Management in the Great Lakes Basin. Great Lakes Fisheries Commission. Spec. Publ., 83(2):7-13.
- Wright, J. H., 1902. A rapid method for differential staining of blood films and malarial parasites. *J. Med. Res.*, 7:138-144.
- Yamanoi, H., Muroga, K. & Takahashi, S., 1980, Physiological characteristics and pathogenicity of NAG vibrio isolated from diseased ayu. *Fish Pathology*, 15: 69-73.

- Yasutake, W.T. & Wales, J.H., 1983. **Microscopic anatomy of salmonids: An Atlas.** USA Department of the Interior. Fish and Wildlife Service, Washington, 190 pp.
- Yoshimizu, M., Kimura, T. & Sakai, M., 1980. Microflora of the embryo and fry of salmonids. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 46: 967-975.
- Yoshimizu, M., Kamiyama, K., Kimura, T. & Sakai, M., 1976. Studies on the intestinal microflora of salmonids. 1. The intestinal microflora of fish reared in freshwater and seawater. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 42: 91-99.

APENDICE 1

APENDICE 1: Composición de los Medios de cultivo, pruebas bioquímicas y sustancias empleadas.

Medios sólidos:

a) *Triptona-Soya-Agar (TSA)*

Se utilizó el medio TSA Merck conforme las indicaciones del producto.

b) *Triptona-Soya-Agar (TSA) + 25ppm NaCl*

Se utilizó el medio TSA Merck conforme las indicaciones del producto Preparada con agua de mar artificial a 20 ‰ de salinidad utilizando formulación de Instant Ocean de Aquarium Systems.

c) *TCBS*

Se utilizó el medio TCBS Difco conforme las indicaciones del producto.

d) *EMB*

Se utilizó el medio EMB Merck conforme las indicaciones del producto.

e) *EMB-25 ‰ NaCl*

Se utilizó el medio EMB Merck conforme las indicaciones del producto preparada con agua de mar artificial a 20 ‰ de salinidad utilizando formulación de Instant Ocean de Aquarium Systems.

f) *Medio de Agar Marino*

Extracto de Levadura	1 g / l
Peptona de Carne	5 g / l
Fe ₃ SO ₄	0.002 g / l
Agar agar	15 g / l
Agua de mar artificial	1 l

PH 7.5

Formulación de/ Agua de Mar artificial

Agua destilada y desionizada	1 l
Salinidad ajustada con sal de Instant Ocean, Aquarium Systems	27 ‰

El medio se esterilizó en autoclave a 120°C y 15 lb/pulg² durante 20 minutos

Crecimiento a 41 ± 1°C

Para determinar la capacidad de las bacterias para crecer a 41 ± 1°C se utilizaron cajas de Petri con medio de Agar Marino. Las cajas fueron inoculadas por estria cruzada e incubadas a 41 ± 1 °C.

Crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl

Para determinar la capacidad de las bacterias para crecer a diferentes concentraciones salinas se utilizó la formulación del medio de Agar Marino, modificando la concentración salina del ASW y eliminando el agar. El medio fue colocado en tubos con tapón de rosca (15 ml por tubo). Las salinidades finales de los medios fue de: 0,30,60,80 y 100 ‰.

Los tubos se inocularon por asada e incubaron a 35°C por 24 h.

Sensibilidad a antibióticos

El medio utilizado para este fin fue Mueller-Hinton Merck preparado con ASW a 22 ‰ NaCl (la salinidad final del medio fue 27 ‰). Se utilizaron Multidiscos Gram (-), de Bigaux Diag.S.A. México. con los siguientes antibióticos Amikacina 30 mcg, Ampicilina 10 mcg, Carbenicilina 100 mcg, Cefalotina 30 mcg, Cefotaxima 30 mcg, Ceftriaxona 30 mcg, Cloranfenicol 30 mcg, Gentamicina 10 mcg, Netilmicina 30 mcg, Nitrofurantoina 300 mcg, Pefloxacina 5 mcg, y Trimetoprim-Sulfametoxazol 25 mcg.

PRUEBAS BIOQUIMICAS

a) Reducción de Nitratos

Medio empleado: Caldo Nitrato (Acumedia)

Preparación: Se preparó en tubos de ensaye 4 ml por tubo

Salinidad: Ajustada a 25 ‰ NaCl

Esterilización: Autoclave 121°C, 15 lbs por 15 min.

Inoculación: A partir de un cultivo de 24 horas en Medio TSA-20 ‰ NaCl.

Incubación: 35°C x 24 h.

Revelado: A las 24 horas de incubación se agregó 1 ml de NIT-1 y 1 ml NIT-2

Composición NIT-1

ó-naftilamina	5 g
Acido Acético (5 N)	1000 ml

Composición NIT-2

Acido Sulfanilico (Acido Para-Aminobenceno Sulfónico)	8 g
Acido Acetico	100 ml

Resultados

+ Rosa-Rojo

- No aparece coloración

b) Rojo de Metilo

Medio empleado: Caldo RM-VP (Bioxon)

Preparación: Se preparó en tubos de ensaye 2.5 ml por tubo

Salinidad: Ajustada a 25 ‰ NaCl

Esterilización: Autoclave 121°C, 15 lbs por 15 min.

Inoculación: A partir de un cultivo de 24 horas en Medio TSA-20 ‰ NaCl.

Incubación: 35°C x 48 h.

Revelado: A las 48 h se agregó solución de rojo de metilo

Composición de la solución de rojo de metilo:

Rojo de Metilo	0.1 g
Alcohol Etilico 95"	300 ml
Agua Destilada	200 ml

Resultados

- + Rojo
- Amarillo

c) Citrato

Medio empleado: Agar Citrato de Simmons (Bioxon)

Preparación: Se preparó en tubos de ensaye 4 ml por tubo de agar inclinado.

Salinidad: Ajustada a 25 ‰ NaCl

Esterilización: Autoclave 121 °C, 15 lbs por 15 min.

Inoculación: A partir de un cultivo de 24 horas en Medio TSA-20 ‰ NaCl.

Incubación: 35°C x 24 h.

Resultados

- + Azul y crecimiento
- Verde sin crecimiento

d) Agar Hierro Triple Azúcar TSI

Medio empleado: Agar Hierro Tres Azucres (Merck)

Preparación: Se preparó en tubos de ensaye 5 ml por tubo de agar inclinado.

Esterilización: Autoclave 121 °C, 15 lbs por 15 min.

Inoculación: A partir de un cultivo puro de 24 horas en Medio TSA-20 ‰ NaCl. a) En cola de pescado sobre pico de flauta y b) Por picadura.

Incubación: 35°C x 18-24 h.

Resultados

- 1.- Solo fermentación de glucosa K/A
 - 2.- Fermentación de Glucosa y Lactosa A/A
 - 3.- No fermentación de Glucosa ni Lactosa K/K
- K Alcalino (Rojo); A Acido (Amarillo)

e) Agar Kligler

Medio empleado: Agar Kligler (Merck)

Preparación: Se preparó en tubos de ensaye 5 ml por tubo de agar inclinado.

Salinidad: Ajustada a 25 ‰ NaCl

Esterilización: Autoclave 121°C, 15 lbs por 15 min.

Inoculación: A partir de un cultivo puro de 24 horas en Medio TSA-20 ‰ NaCl. a) En cola de pescado sobre pico de flauta y b) Por picadura.

Incubación: 35°C x 18-24 h.

Resultados

- 1.- Solo fermentación de glucosa K/A
- 2.- Fermentación de Glucosa y Lactosa A/A
- 3.- No fermentación de Glucosa ni Lactosa K/K

K Alcalino (Rojo); A Acido (Amarillo)

f) Reacción de Oxidación-Fermentación de Sacarosa

Medio empleado: Medio Basal O-F (Difco)

Preparación: Se preparó y esterilizó el medio basal en autoclave 121 °C, 15 lbs por 15 min. Se dejó enfriar a 40-45 ° C en baño María. Se agregaron 10 ml/l de solución acuosa de Sacarosa 10 %, esterilizada por filtración con membrana millipore 0.45 µ. La mezcla se vació en tubos de ensaye estériles (3.5 ml por tubo).

Salinidad: Ajustada a 25 ‰ NaCl

Inoculación: A partir de un cultivo puro de 18-24 horas en Medio TSA-20 ‰ NaCl. 2 tubos por cepa por picadura. Uno de los tubos de cada cepa se cubrió con Aceite mineral esterilizado por filtración con membrana millipore 0.45 µ.

Incubación: 35°C x 48 h.

Resultados

Metabolismo	Tubo Tapado	Tubo Abierto
1.- Oxidativo	Verde	Amarillo
2.- Fermentativo	Amarillo	Amarillo
3.- Neutro	Verde	Verde

g) Descarboxilación de Aminoácidos

Medio empleado: Moeller Decarboxylase Broth (Acumedia)

Preparación: Se preparó en tubos de ensaye 3.5 ml por tubo en las siguientes formas:

- 1.- Con 1 % w/v Diclorhidrato de L(+)-Lisina
- 2.- Con 1 % w/v Diclorhidrato de L(+)-Ornitina
- 3.- Con 1 % w/v Monoclorhidrato de L(+)-Arginina
- 4.- Sin aminoácido

Salinidad: Ajustada a 25 ‰ NaCl

Esterilización: Autoclave 121°C, 15 lbs por 15 min.

Inoculación: A partir de un cultivo puro de 24 horas en Medio TSA-20 ‰ NaCl. Las cuatro formas para cada cepa. Los tubos se cubrieron con 2 ml de Aceite Mineral esterilizado por filtración.

Incubación: 35°C por 24-96 h.

Resultados

+ Azul

- Amarillo claro

h) Motilidad

Medio empleado: Motility Test Medium (Difco)

Preparación: Se preparó en tubos de ensaye 3.5 ml por tubo conforme indicaciones del producto.

Salinidad: Ajustada a 25 ‰ NaCl

Esterilización: Autoclave 121°C, 15 lbs por 15 min.

Inoculación: A partir de un cultivo de 24 horas en Medio TSA-20 ‰ NaCl. Por picadura.

Incubación: a) 35°C por 24-48 h y 25 °C por 7 días.

Resultados

+ El crecimiento migra de la línea de siembra y produce turbiedad en el medio.

- (sin motilidad) Se mantiene claro el medio, crecimiento solo en la línea de siembra

j)Reacción de Voges Proskauer

Medio empleado: Caldo RM-VP (Bioxon)

Preparación: Se preparó en tubos de ensaye 4 ml por tubo

Salinidad: Ajustada a 25 ‰ NaCl

Esterilización: Autoclave 121 °C, 15 lbs por 15 min.

Inoculación: A partir de un cultivo de 24 horas en Medio TSA-20 ‰ NaCl.

Incubación: 35°C x 24-48 h.

Revelado: Posterior al tiempo de incubación se agregó 0.6 ml de solución de Ó-naftol al 5% y 0.2 ml de solución KOH al 40%.

Solución de Ó-Naftol (Intensificador de color)

Ó-NAftol(1 -naftol) 5 g

Alcohol Etílico (absoluto) 100 ml

Solución de Hidróxido de Potasio (Agente Oxidante)

KOH 40 g

Agua Destilada y Desionizada 100 ml

Resultados

+ Presencia Acetoína: color rojo en la superficie

- Amarillo en la superficie

Composición del Estándar 0.5 de Mac Farland

Ba Cl₂ 2H₂O 0.048 M 0.5 ml

H₂SO₄ 0.36 N 99.5 ml

TÉCNICA DE TINCION DE CELULAS SANGUINEAS (MODIFICADA DE WRIGTH, 1902)

- 1.- El frotis se dejó secar a temperatura ambiente por **24** horas.
- 2.- Se agregó agua corriente 10 gotas para humedecer el frotis.
- 3.- Se agregó colorante de Wright con pipeta Pasteur sobre el frotis hasta cubrir la totalidad de área con células.
- 4.- Tiempo de colorante 5 minutos.
- 5.- Se agregó agua corriente con pipeta Pasteur sobre el portaobjetos aproximadamente la misma cantidad de colorante que se había agregado.
- 6.- Se agitó ligeramente con movimientos circulares para que el colorante y el agua se mezclaran.
- 7.- Se dejó 3 minutos la mezcla.
- 8.- El porta se sumergió en un vaso de precipitados con agua corriente por un minuto.
- 9.- El porta se colocó entre dos hojas de papel secante.
- 10.- Los frotis teñidos se montaron en resina sintética.

TECNICA DE CONTEO DE PLAQUETAS MEDIANTE CAMARA

- 1.- **Se** llena hasta la marca de 1 con sangre heparinizada la pipeta para conteo de globulos rojos.
- 2.- Se diluye con oxalato de amonio al 1% hasta la marca de 101.
- 3.- Se agita suavemente la pipeta por aproximadamente 3 minutos.
- 4.- Se carga la **camara** de New-bauer y se deja en reposo por 15 minutos.
- 5.- Se contabiliza al microscopio.

SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIOTICOS

Se determinó sensibilidad a antibióticos *in vitro* en medio sólido Mueller-Hinton (27 ‰ NaCl) usando Multidiscos Gram (-), de Bigaux Diag.S.A. México.

Las cepas aisladas del genero *Vibrio* fueron sensibles a Ceftriaxona, Trimetoprim Sulfametoxazol, Cefotaxima, Netilmicina y Nitrofurantoina y resistentes o insensibles a Cefalotina, Amikacina y Carbenicilina; con los otros antibióticos se obtuvieron resultados variables (Tabla 12).

Tabla 12.- Sensibilidad a antibióticos.

Antibiótico	7	8	10	11	12	13	14
Cefalotina	I	I	I	R	R	I	I
Cloranfenicol	S	S	S	S	S	I	I
Ceftriaxona	S	S	S	S	S	S	I
Ampicilina	R	I	I	I	I	R	R
Amikacina	S	S	I	S	S	S	R
Trimetoprim Sulfametoxazol	S	S	S	S	S	S	S
Cefotaxima	S	S	S	S	S	S	S
Gentamicina	S	S	S	S	S	S	I
Netilmicina	S	S	S	S	S	S	S
Pefloxacina	I	S	I	S	I	S	S
Carbenicilina	R	R	R	R	R	R	R
Nitrofurantoina	S	S	S	S	S	S	S

R=Resistente; I=Intermedia; MS=Moderadamente Sensible; S=Sensible

Cefalotina	30 mcg	Cefotaxima	30 mcg
Cloranfenicol	30 mcg	Gentamicina	10 mcg
Ceftriaxona	30 mcg	Netilmicina	30 mcg
Ampicilina	10 mcg	Pefloxacina	5 mcg
Am ikacina	30 mcg	Carbenicilina	100 mcg
Trim. Sulfa.	25 mcg	Nitrofurantoina	300 mcg

APENDICE 2

APENDICE 2.- PARAMETROS FISICOS Y QUIMICOS REGISTRADOS EN EL SISTEMA DE INDUCCIÓN AL DESOVE Y CALCULOS ESTADISTICOS.

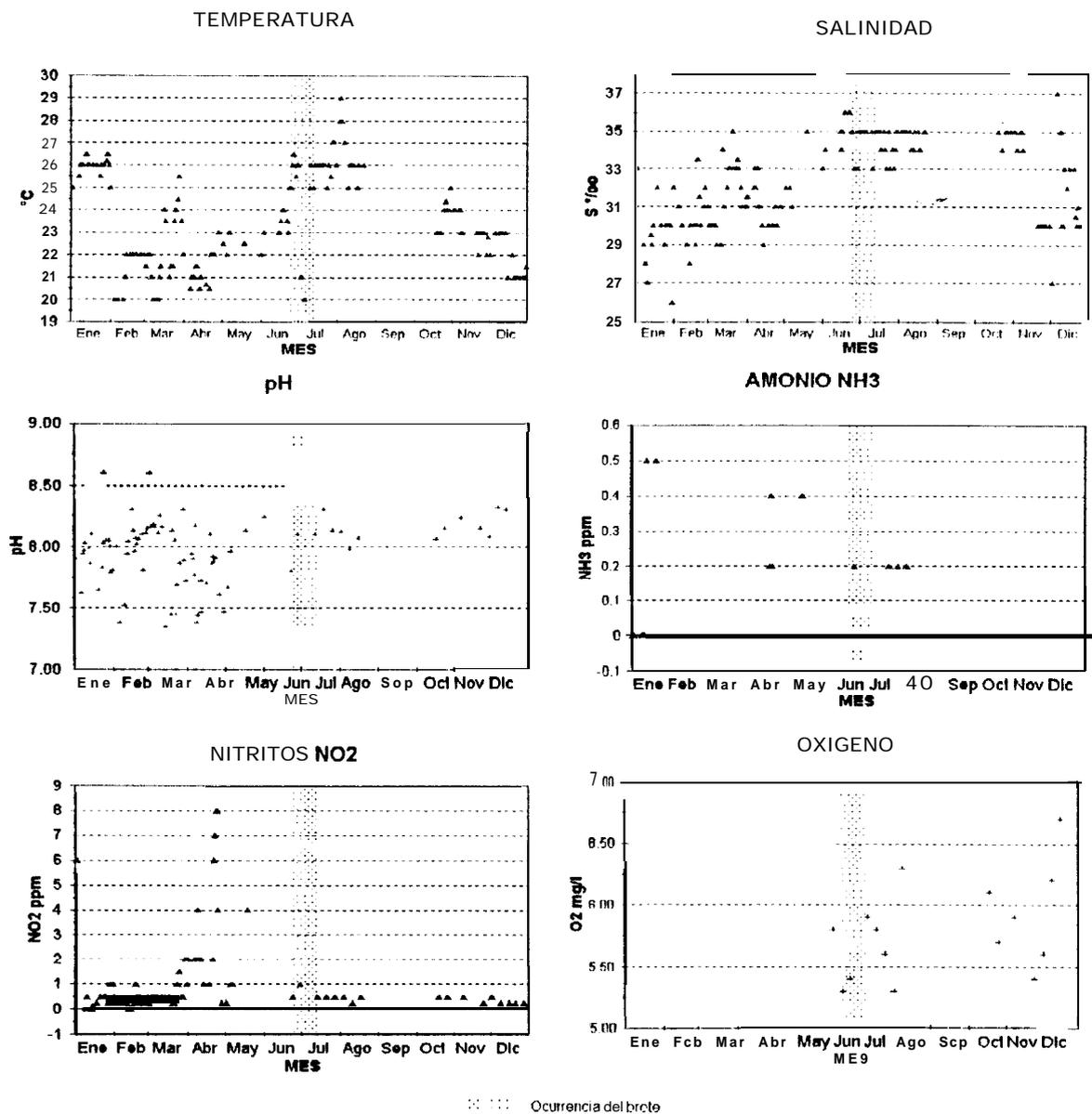


Figura 7 .- Parametros fisicos dentro del sistema de inducción al desove.

Tabla 1 1.- Parametros físicos y químicos recomendados y promedios registrados dentro del sistema de inducción al desove.

PARAMETRO	RECOMENDADO*	MEDIDO**
Salinidad	$\approx 35 \text{ ‰}$	32.25 ± 0.3697
Temperatura	25-30 °C	23.48 ± 0.3319
NO,	< 0.5 mg/l	1.0456 ± 0.324
NH,	< 1.0 mg/l	0.0357 ± 0.022
O ,	≥ 5.0 mg/l	5.8 ± 0.2
pH	8	7.95 ± 0.0055

* Tomado de Stíckney & Kohler, 1992

** Media (intervalo al 95 % confianza)

CALCULOS ESTADISTICOS

1.- Estimación del *intervalo de confianza para /os porcentajes de leucocitos en peces sanos*

Dato	L	M&M	GRAN	T
1	21	0	0	25
2	23	0	1	29
3	23	0	1.72	30
4	24	0.99	1.98	33
5	24	1	2	34.29
6	26	1	2	36.27
7	26	1	2	37
8	26.73	1	3	37
9	28	1.72	3	37.62
10	30	1.96	3.81	38
11	30	2	4	38
12	32	2	4	40
13	32	2	4	41
14	34	2	5	41
15	34	2	5	42
16	34	2	5	42
17	35	2	5	42
18	35.64	2.97	6	43
19	37.25	2.97	6	43
20	39	3	6	43
21	39	3	6	43.97
22	41.58	3	6.86	44
23	42	3	6.86	44
24	42	3	7	46
25	43	3	7	46
26	43	3	7	47
27	43	4	7	47
28	43.56	4	9	47.52
29	46	4	9	48.51
30	47	4	9	50
31	48	4	9.90	51.49
32	49	4	9.90	52
33	49	4	10	53
34	49.02	4	10	53.92
35	49.5	4	10	54
36	50	4	10	55
37	51	4	10.89	56
38	51	5	11	57
39	52	5.71	11	58
40	52.59	6	11.88	59
41	53	6.93	12	59
42	54	7	13	59
43	56	7.84	14	59.41
44	56.19	8	15	60
45	57	8	17	61
46	61	8	18	61
47	61	8	18	68
48	62	9	20	71

Tipo celular	Media	Desviación estandar
Linfocitos	41.4	11.4
Monocitos y Macrofagos	3.6	2.3
Granulocitos	7.85	4.76
Trombocitos	47.2	10.2

Intervalo para la media μ

Limites de confianza con el 95 % de confianza

$$L = \bar{x} \pm \left[t_{\alpha/2, n} \frac{s}{\sqrt{n}} \right]$$

$$t_{0.05|40} = 2.021$$

$$t_{0.01|40} = 2.021$$

Tipo celular	95%	99%
Linfocitos	38.07 < μ < 44.72	37.41 < μ < 45.38
Monocitos y Macrofagos	2.929 < μ < 4.270	2.790 < μ < 4.400
Granulocitos	6.460 < μ < 9.238	6.510 < μ < 9.514
Trombocitos	44.22 < μ < 50.17	43.63 < μ < 50.76

Prueba de Kolmogorov Smirnov con distribución normal LINFOCITOS

Y	obs	calc	F1	F2	F1/n1	F2/n2	d
12	0	0	0	0	0	0	0
13	0	1	0	1	0	0.020833	0.020833
14	0	0	0	1	0	0.020833	0.020833
15	0	0	0	1	0	0.020833	0.020833
16	0	0	0	1	0	0.020833	0.020833
17	0	0	0	1	0	0.020833	0.020033
18	0	0	0	1	0	0.020833	0.020833
19	0	0	0	1	0	0.020033	0.020833
20	0	0	0	1	0	0.020833	0.020833
21	1	1	1	2	0.020833	0.041667	0.020833
22	0	0	1	2	0.020833	0.041667	0.020033
23	2	1	3	3	0.0625	0.0625	0
24	2	0	5	3	0.104167	0.0625	0.041667
25	0	0	5	3	0.104167	0.0625	0.041667
26	2	0	7	3	0.145833	0.0625	0.003333
27	1	0	8	3	0.166667	0.0625	0.104167
28	1	1	9	4	0.1875	0.003333	0.104167
29	0	3	9	7	0.1875	0.145033	0.041667
30	2	1	11	8	0.229167	0.166667	0.0625
31	0	3	11	11	0.229167	0.229167	0
32	2	1	13	12	0.270833	0.25	0.020833
33	0	1	13	13	0.270833	0.270833	0
34	3	2	16	15	0.333333	0.3125	0.020833
35	1	1	17	16	0.354167	0.333333	0.020833
36	1	0	18	16	0.375	0.333333	0.041667
37	0	1	18	17	0.375	0.354167	0.020833
38	1	3	19	20	0.395833	0.416667	0.020833
39	2	3	21	23	0.4375	0.479167	0.041667
40	0	2	21	25	0.4375	0.520633	0.083333
41	0	1	21	26	0.4375	0.541667	0.104167
42	3	1	24	27	0.5	0.5625	0.0625
43	3	3	27	30	0.5625	0.625	0.0625
44	1	2	28	32	0.583333	0.666667	0.083333
45	0	1	28	33	0.583333	0.6875	0.104167
46	1	2	29	35	0.604167	0.729167	0.125
47	1	1	30	36	0.625	0.75	0.125
48	1	3	31	39	0.645833	0.8125	0.166667
49	2	3	33	42	0.6875	0.875	0.1875 D max
50	3	1	36	43	0.75	0.895833	0.145833
51	2	0	38	43	0.791667	0.895833	0.104167
52	1	0	39	43	0.8125	0.895833	0.083333
53	2	1	41	44	0.854167	0.916667	0.0625
54	1	0	42	44	0.875	0.916667	0.041667
55	0	2	42	46	0.875	0.958333	0.083333
56	1	1	43	47	0.895833	0.979167	0.083333
57	2	0	45	47	0.9375	0.979167	0.041667
58	0	0	45	47	0.9375	0.979167	0.041667
59	0	0	45	47	0.9375	0.979167	0.041667
60	0	0	45	47	0.9375	0.979167	0.041667
61	2	0	47	47	0.979167	0.979167	0
62	1	0	48	47	1	0.979167	0.020033
63	0	0	48	47	1	0.979167	0.020833
64	0	0	48	47	1	0.979167	0.020833
65	0	0	48	47	1	0.979167	0.020033
66	0	0	46	47	1	0.979167	0.020833
67	0	1	46	48	1		0
68	0	0	48	48	1	1	0
69	0	0	48	46	1		0

Prueba de Kolmogorov Smirnov con distribución normal MONOCITOS

Y	obs	calc	F1	F2	F1/n1	F2/n2	d
-1	0	0	0	0	0	0	0
-0.5	0	0	0	0	0	0	0
0	3		3		0.0625	0.020833	0.041667
0.5	0		3	2	0.0625	0.041667	0.020833
1	5	2	8	4	0.166667	0.083333	0.083333
1.5	0	2	8	6	0.166667	0.125	0.041667
2	9	3	17	9	0.354167	0.1875	0.166667
2.5	0	1	17	10	0.354167	0.208333	0.145833
3	9	5	26	15	0.541667	0.3125	0.229167 D max
3.5	0	5	26	20	0.541667	0.416667	0.125
4	11		37	27	0.770833	0.5625	0.208333
4.5	0	2	37	29	0.770833	0.604167	0.166667
5		4	38	33	0.791667	0.6875	0.104167
5.5	0	4	38	37	0.791667	0.770833	0.020833
6	2		40	38	0.833333	0.791667	0.041667
6.5	0	2	40	40	0.833333	0.833333	0
7	2	2	42	42	0.875	0.875	0
7.5	0	0	42	42	0.875	0.875	0
8	5	4	47	46	0.979167	0.958333	0.020833
8.5	0		47	47	0.979167	0.979167	0
9		0	48	47	1	0.979167	0.020833
9.5	0	0	48	47		0.979167	0.020833
10	0		48	48	1	1	0

Prueba de Kolmogorov Smirnov con distribución normal GRANULOCITOS

Y	obs	calc	F1	F2	F1/n1	F2/n2	d
-3	0	1	0	0	0	0	0
-2	0	0	0		0	0.020833	0.020833
-1	0	2	0	3	0	0.0625	0.0625
0	1	0	1	3	0.020833	0.0625	0.041667
1		0	2	3	0.041667	0.0625	0.020833
2	5	1	7	4	0.145833	0.083333	0.0625
3	2	3	9	7	0.1875	0.145833	0.041667
4	4	1	13	8	0.270833	0.166667	0.104167
5	4	5	17	13	0.354167	0.270833	0.083333
6	4	3	21	16	0.4375	0.333333	0.104167
7	6	3	27	19	0.5625	0.395833	0.166667 D max
8	0	6	27	25	0.5625	0.520833	0.041667
9	3	3	30	28	0.625	0.583333	0.041667
10	6	0	36	28	0.75	0.583333	0.166667
11	3	5	39	33	0.8125	0.6875	0.125
12	2	2	41	35	0.854167	0.729167	0.125
13		2	42	37	0.875	0.770833	0.104167
14		4	43	41	0.895833	0.854167	0.041667
15		3	44	44	0.916667	0.916667	0
16	0	2	44	46	0.916667	0.958333	0.041667
17	1	1	45	47	0.9375	0.979167	0.041667
18	2		47	48	0.979167	1	0.020833
19	0	0	47	48	0.979167	1	0.020833
20	1	0	46	48	1	1	0

Prueba de Kolmogorov Smirnov con distribución normal TROMBOCITOS

Y	obs	calc	F1	F2	F1/n1	F2/n2	d
25	1	1	1	1	0.020833	0.020833	0
26	0	0	1	1	0.020833	0.020833	0
27	0	0	1	1	0.020833	0.020833	0
26	0	0	1	1	0.020833	0.020833	0
29	1	0	2	1	0.041667	0.020833	0.020833
30	1	0	3	1	0.0625	0.020833	0.041667
31	0	1	3	2	0.0625	0.041667	0.020833
32	0	0	3	2	0.0625	0.041667	0.020833
33	1	0	4	2	0.083333	0.041667	0.041667
34	0	2	4	4	0.083333	0.083333	0
35	1	0	5	4	0.104167	0.083333	0.020833
36	0	1	5	5	0.104167	0.104167	0
37	3	0	a	5	0.166667	0.104167	0.0625
38	3	1	11	6	0.229167	0.125	0.104167
39	0	0	11	6	0.229167	0.125	0.104167
40	1	1	12	7	0.25	0.145833	0.104167
41	2	2	14	9	0.291667	0.1875	0.104167
42	3	2	17	11	0.354167	0.229167	0.125
43	3	4	20	15	0.416667	0.3125	0.104167
44	3	1	23	16	0.479167	0.333333	0.145833 D max
45	0	4	23	20	0.479167	0.416667	0.0625
46	2	1	25	21	0.520833	0.4375	0.083333
47	2	5	27	26	0.5625	0.541667	0.020833
48	1	4	28	30	0.583333	0.625	0.041667
49	1	1	29	31	0.604167	0.645833	0.041667
50	1	3	30	34	0.625	0.708333	0.083333
51	0	2	30	36	0.625	0.75	0.125
52	2	1	32	37	0.666667	0.770833	0.104167
53	1	1	33	38	0.6875	0.791667	0.104167
54	2	2	35	40	0.729167	0.833333	0.104167
55	1	2	36	42	0.75	0.875	0.125
56	1	0	37	42	0.770833	0.875	0.104167
57	1	0	38	42	0.791667	0.875	0.083333
58	1	0	39	42	0.8125	0.875	0.0625
59	3	0	42	42	0.875	0.875	0
60	2	0	44	42	0.916667	0.875	0.041667
61	2	1	46	43	0.958333	0.895833	0.0625
62	0	0	46	43	0.958333	0.895633	0.0625
63	0	2	46	45	0.958333	0.9375	0.020833
64	0	2	46	47	0.958333	0.979167	0.020833
65	0	0	46	47	0.958333	0.979167	0.020833
66	0	0	46	47	0.958333	0.979167	0.020833
67	0	0	46	47	0.958333	0.979167	0.020833
68	1	0	47	47	0.979167	0.979167	0
69	0	1	47	48	0.979167	1	0.020833
70	0	0	47	48	0.979167	1	0.020833
71	1	0	48	48	1	1	0

3.-Significancia de las diferencias encontradas entre los porcentajes de leucocitos entre peces sanos y enfermos. Prueba no parametrica de Wilcoxon y Mann-Witney de rangos asignados.

LINFOCITOS		MONOCITOS		GRANULOCITOS		TROMBOCITOS	
------------	--	-----------	--	--------------	--	-------------	--

SANOS		ENFERMO S													
-------	--	-----------	--	-------	--	-----------	--	-------	--	-----------	--	-------	--	-----------	--

L	R	L	R	M&M	R	M&M	R	GRAN	R	GRAN	R	T	R	T	R
21	1	23	3	0	2	67	49	0	2.5	0	2.5	25	6	2	2
23	3	24	6	0	2	69	50	1	5	0	2.5	26	7	2	2
23	3	25	8.5	0	2	71	51	1.724	6	0	2.5	30	8	2	2
24	6	25	8.5	0.99	4	72	52	1.98	7	4	15.5	33	9	3	3
24	6	27	13	1	6.5	73	53	2	9	7	30	34.29	10	4	4
26	10.5			1	6.5			2	9			36.27	11		
26	10.5			1	6.5			2	9			37	12.5		
26.73	12			1	6.5			3	11.5			37	12.5		
28	14			1.724	9			3	11.5			37.62	14		
30	15.5			1.961	10			3.81	13			38	15.5		
30	15.5			2	14			4	15.5			38	15.5		
32	17.5			2	14			4	15.5			40	17		
32	17.5			2	14			4	15.5			41	18.5		
34	20			2	14			5	18			41	18.5		
34	20			2	14			5	20			42	21		
34	20			2	14			5	20			42	21		
35	22			2	14			5	20			42	21		
35.64	23			2.97	18.5			6	23.5			43	24		
37.25	24			2.97	18.5			6	23.5			43	24		
39	25.5			3	23			6	23.5			43	24		
39	25.5			3	23			6	23.5			43.97	27		
41.58	27			3	23			6.863	26.5			44	27		
42	28.5			3	23			6.863	26.5			44	27		
42	28.5			3	23			7	30			46	29.5		
43	31			3	23			7	30			46	29.5		
43	31			3	23			7	30			47	31.5		
43	31			4	32			7	30			47	31.5		
43.56	33			4	32			9	34			47.52	33		
46	34			4	32			9	34			48.51	34		
47	35			4	32			9	34			50	35		
48	36			4	32			9.901	36.5			51.49	36		
49	38			4	32			9.901	36.5			52	37		
49	38			4	32			10	39.5			53	38		
49.02	38			4	32			10	39.5			53.92	39		
49.5	40			4	32			10	39.5			54	40		
50	41			4	32			10	39.5			55	41		
51	42.5			4	32			10.89	42			56	42		
51	42.5			5	38			11	43.5			57	43		
52	44			5.714	39			11	43.1			58	44		
52.59	45			6	40			11.83	45			59	46		
53	46			6.931	41			12	46			59	46		
54	47			7	42			13	47			59	46		
56	48			7.843	43			14	48			59.41	48		
58.19	49			8	45.5			15	49			60	49		
57	50			8	45.5			17	50			61	50.5		
61	51.5			8	45.5			16	51.5			61	50.5		
61	51.5			8	45.5			16	51.5			68	55		
62	53			9	48			20	53			71	53		
n1	1392	n2	39	n1	1176	n2	255	n1	1378	n2	53	n1	1419	n2	13

LINFOCITOS		MONOCITOS		GRANULOCITOS		TROMBOCITOS	
------------	--	-----------	--	--------------	--	-------------	--

SANOS	ENFERMO S	SANOS	ENFERMO S	SANOS	ENFERMO S	SANOS	ENFERMO S
-------	--------------	-------	--------------	-------	--------------	-------	--------------

L	t	L	t	M&M	t	M&M	t	GRAN	t	GRAN	t	T	t	T	t
21		23		0		87		6		6		25		2	
23		24		0		69		1		0		29		2	
23		25		0		71		1.724		0		30		2	
24		25		0.99		72		1.98		4		33		3	
24		27		1		73		2		7		34.26		4	
26				1				2				36.27			
26				1				2				37			
26.73				1				3				37			
28				1.724				3				37.62			
30				1.961				3.81				38			
30				2				4				38			
32				2				4				40			
32				2				4				41			
34				2				5				41			
34				2				5				42			
34				2				5				42			
35				2				5				42			
35.64				2.97				6				43			
37.25				2.97				6				43			
39				3				6				43			
39				3				6				43.97			
41.58				3				6.863				44			
42				3				6.863				44			
42				3				7				46			
43				3				7				46			
43				3				7				47			
43				4				7				47			
43.56				4				9				47.52			
45				4				9				48.51			
47				4				9				50			
48				4				9.901				51.49			
49				4				9.901				52			
49				4				10				53			
49.02				4				10				53.02			
49.5				4				10				54			
50				4				10				55			
51				4				10.89				55			
51				5				11				57			
52				5.714				11				58			
52.59				6				11.88				59			
53				6.931				12				59			
54				7				13				59			
56				7.843				14				59.41			
56.19				8				15				60			
57				8				17				61			
61				8				18				61			
61				8				18				68			
62				8				20				71			
n1		n2		n1		n2		n1		n2		n1		n2	

Wilcoxon

LINFOCITOS				MONOCITOS			GRANULOCITOS				TROMBOCITOS				
nl	1392	n2	39	nl	11761	n2	255	nl	1378	n2	53	nl	1419	n2	13
C=	216				0				202				242		

Us MANN-WITNEY

2	48	0.5	0
4	48	0.5	0
5	48	0.5	0
5	48	12	0
8	48	25	0

Us= 216 0 202 240

Significancia de Us

ts= 2.921 -3.650 2.496 3.651

Como existen valores empatados dentro de las muestras, el estimador de ts es:

$$t_s = \frac{U_s - \frac{n_1 - n_2}{2}}{\sqrt{\left[\frac{n_1 n_2}{(n_1 + n_2)(n_1 + n_2 - 1)} \right] \left[\frac{(n_1 + n_2)^3 - (n_1 + n_2 - \sum T)}{12} \right]}}$$

Donde

$\sum T$ = es la suma de los valores repetidos para cada muestra.