



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Ciencias Biológicas

Unidad de Posgrado

**Caracterización molecular de bacterias patógenas
causantes de enfermedades en cultivo de tilapia
Oreochromis niloticus (Linnaeus, 1758) en un sistema
intensivo en el departamento de Lima**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

AUTOR

Verónica Anamaría SIERRALTA CHICHIZOLA

ASESOR

Dra. Egma Marcelina MAYTA HUATUCO

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Sierralta, V. (2019). *Caracterización molecular de bacterias patógenas causantes de enfermedades en cultivo de tilapia Oreochromis niloticus (Linnaeus, 1758) en un sistema intensivo en el departamento de Lima*. Tesis para optar grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Escuela de Posgrado, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

HOJA DE MEGADATOS COMPLEMENTARIOS

CÓDIGO ORCID DEL AUTOR: <https://orcid.org/0000-0002-7985-1769>

CÓDIGO ORCID DEL ASESOR: <https://orcid.org/0000-0001-8471-1675>

DNI DEL AUTOR: 40250271

GRUPO DE INVESTIGACIÓN:

INSTITUCIÓN QUE FINANCIA PARCIAL O TOTALMENTE LA INVESTIGACIÓN: Autofinanciada.

UBICACIÓN GEOGRÁFICA DONDE SE DESARROLLÓ LA INVESTIGACIÓN, DEBE INCLUIR LOCALIDADES Y COORDENADAS GEOGRÁFICAS:

Carretera Panamericana Norte Km. 168, Provincia de Huaura, Departamento de Lima (11.08 °S, 77.60 °W).

AÑO O RANGO DE AÑOS QUE LA INVESTIGACIÓN ABARCÓ: Noviembre del año 2013 a octubre del 2015.



Exped. N° 045-UPG-FCB-2019

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO
ACADEMICO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Siendo las...14:05... horas del día 20:05:2019...en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas, el Jurado de Tesis presidido por la:

- Dr. Mauro Gilber Mariano Astocondo (Presidente)
- Dr. Carlos Francisco Cabrera Carranza (Miembro)
- Dr. Enrique Walter Mamani Zapana (Miembro)
- Dra. Egma Marcelina Mayta Huatuco (Asesora)

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar al Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas, que solicitara la Señorita Magíster Doña **VERÓNICA ANAMARÍA SIERRALTA CHICHIZOLA**.

Después de darse lectura al Expediente N° 045-UPG-FCB-19, en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado, recepcionaron la exposición de la Tesis Titulada:

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS PATÓGENAS CAUSANTES DE ENFERMEDADES EN CULTIVO DE TILAPIA *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) EN UN SISTEMA INTENSIVO EN EL DEPARTAMENTO DE LIMA”, y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduando.



Acto seguido el Jurado procedió a la votación la que dio como resultado el calificativo de:*Muy Bueno con la nota de 18*.....

A continuación el Presidente del Jurado de Tesis recomienda que la Facultad proponga que la Universidad le otorgue el grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas a la Magíster VERÓNICA ANAMARÍA SIERRALTA CHICHIZOLA

Siendo las...18:25... se levantó la Sesión, recibiendo la graduando las felicitaciones de los señores miembros del Jurado y público asistente.

Se extiende la presente Acta en Lima, el día lunes 20 del mes de mayo del año 2019.

Dr. Mauro Giber Mariano Astocondor
Profesor Principal a D.E.
PRESIDENTE
REGINA N° 13588

Dra. Egma M. Mayta Huatuco
Profesora Principal a D.E.
ASESORA
REGINA N° 13619

Dr. Carlos F. Cabrera Carranza
Profesor Principal a D. E.
MIEMBRO
DINA N° 24761

Dr. Enrique W. Mamani Zapana
Profesor Principal a D.E.
MIEMBRO
REGINA N° 15757

AGRADECIMIENTOS

Mis sinceros agradecimientos a todas aquellas personas que me apoyaron incondicionalmente para realizar este estudio.

En especial a la Dra. Egma Mayta por orientarme y asesorarme en la elaboración y ejecución de esta tesis.

A los Magísteres Jorge León y Violeta Flores por brindarme su paciencia y recomendaciones para poder concluir este trabajo.

A los biólogos Andrea Gutiérrez y Diego Marquez por su apoyo logístico en el muestreo de los peces y forma de aplicación de programas bioinformáticos.

A la Empresa Bides por su colaboración en la extracción de ADN bacteriano y aplicación de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

DEDICATORIA

A Dios porque en él hallo la fuerza necesaria para luchar en la vida.

A mis padres, quienes me apoyan, motivan y me dan aliento para seguir adelante en cada proyecto que emprendo.

INDICE GENERAL

LISTA DE TABLAS	i
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	x
ABSTRACT	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Tilapia	5
2.2 Características generales	6
2.3 Importancia del cultivo en el Perú	6
2.4 Características del sistema de cultivo intensivo	7
2.5 Tecnología biofloc	7
2.5.1 Rol de los microorganismos en el sistema Biofloc	8
2.5.2 Efecto probiótico natural de Biofloc	9
2.6 Enfermedades bacterianas en tilapia	10
2.6.1 Edwardsielosis	10
2.6.2 Citrobacteriosis	16
2.6.3 Enfermedad producida por <i>Plesiomonas shigelloides</i>	19
2.6.4 Vibriosis	23
2.6.5 Shewanellosis	32
2.6.6 Septicemia hemorrágica por <i>Aeromonas</i>	38
2.7 Identificación molecular bacteriana	42
2.8 Medidas de manejo	44
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	47
3.1 Objetivo general	47
3.2 Objetivos específicos	47
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	48
4.1 Lugar de muestreo	48
4.2 Muestreo de campo	49
4.3 Muestras biológicas	50
4.4 Procesamiento en el laboratorio	50

4.5 Manejo de las muestras	51
4.5.1 Procesamiento bacteriano	51
4.5.2 Sensibilidad antibiótica	52
4.5.3 Identificación bacteriana mediante secuenciación del gen 16S ARNr	53
4.5.4 Procesamiento histológico	55
4.6 Medidas de manipulación sanitaria del centro de cultivo	56
4.7 Análisis estadístico	56
4.8 Frecuencia de peces con síntomas de enfermedad	57
V. RESULTADOS	58
5.1 Familia enterobacteriaceae en peces sintomáticos	58
5.1.1 Aislamiento y caracterización de la bacteria <i>Edwardsiella tarda</i>	58
5.1.2 Sensibilidad antibiótica	63
5.1.3 Estudio anatomopatológico	67
5.1.4 Aislamiento y caracterización de la bacteria <i>Citrobacter</i> <i>freundii</i>	73
5.1.5 Sensibilidad antibiótica	77
5.1.6 Estudio anatomopatológico	81
5.1.7 Aislamiento y caracterización de la bacteria <i>Plesiomonas</i> <i>shigelloides</i>	84
5.1.8 Sensibilidad antibiótica	88
5.1.9 Estudio anatomopatológico	89
5.2 Familia Vibrionaceae	95
5.2.1 Aislamiento y caracterización de la bacteria <i>Vibrio</i> <i>alginolyticus</i>	95
5.2.2 Sensibilidad antibiótica	99
5.2.3 Estudio anatomopatológico	100
5.2.4 Aislamiento y caracterización de la bacteria <i>Vibrio cholerae</i>	102
5.2.5 Sensibilidad antibiótica	105
5.2.6 Estudio anatomopatológico	107
5.3 Familia Shewanellaceae	111
5.3.1 Aislamiento y caracterización de la bacteria <i>Shewanella</i> <i>putrefaciens</i>	111
5.3.2 Sensibilidad antibiótica	114

5.3.3 Estudio anatomopatológico	115
5.3.4 Aislamiento y caracterización de la bacteria <i>Shewanella algae</i>	119
5.3.5 Sensibilidad antibiótica	122
5.3.6 Estudio anatomopatológico	123
5.4 Familia Aeromonadaceae	128
5.4.1 Aislamiento y caracterización de la bacteria <i>Aeromonas caviae</i>	128
5.4.2 Sensibilidad antibiótica	133
5.4.3 Estudio anatomopatológico	134
5.5 Identificación molecular de bacterias	139
5.5.1 Producto de amplificación de la región 16S ARNr por PCR	139
5.5.2 Secuencias de región 16S ARNr de cepas bacterianas	141
5.5.3 Análisis filogenético	143
5.6 Características de la calidad del agua de cultivo	146
5.7 Frecuencia de peces con síntomas de enfermedad	146
5.7.1 Factores asociados a la presencia de peces sintomáticos	152
5.8 Manejo sanitario de la piscigranja	155
VI. DISCUSIÓN	160
6.1 Bacterias aisladas de peces sintomáticos	160
6.1.1 <i>Edwardsiella tarda</i>	160
6.1.2 <i>Citrobacter freundii</i>	163
6.1.3 <i>Plesiomonas shigelloides</i>	164
6.1.4 <i>Vibrio cholerae</i>	166
6.1.5 <i>Vibrio alginolyticus</i>	168
6.1.6 <i>Shewanella putrefaciens</i>	169
6.1.7 <i>Shewanella algae</i>	171
6.1.8 <i>Aeromonas caviae</i>	172
6.2 Árbol filogenético	174
6.3 Características de la calidad del agua	176
6.4 Frecuencia de peces con síntomas de enfermedad	177
6.4.1 Factores asociados a la presencia de peces sintomáticos	177
6.5 Manejo sanitario del centro de cultivo	178

VII. CONCLUSIONES	180
VIII. RECOMENDACIONES	182
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	184
X. ANEXOS	202
X.1 Ficha de historia clínica	203
X.2 Flujograma general de procesos	205
X.3 Flujograma de procedimientos de identificación bacteriana mediante pruebas bioquímicas	206
X.4 Flujograma de sensibilidad antibiótica	207
X.5 Flujograma de procedimiento para la identificación bacteriana mediante secuenciación del gen 16S ARNr	208
X.6 Flujograma de procesamiento histológico	209
X.7 Inclusión de bloques de tejido con parafina líquida	210
X.8 Secuencias de la región 16S ARNr de los géneros bacterianos evaluados y de las cepas referenciales ATCC	211
X.9 Cromatogramas de cepa <i>Plesiomonas shigelloides</i>	232
X.10 Glosario	233

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tamaño de las muestras de tilapia *O. niloticus* de acuerdo a la fase de producción.

Tabla 2. Características bioquímicas de *E. tarda* aisladas de tilapia *Oreochromis niloticus*.

Tabla 3. Caracterización bioquímica con el Sistema API 20 E de las cepas de *E. tarda* aisladas de tilapia *Oreochromis niloticus*.

Tabla 4. Sensibilidad antibiótica *in vitro* de cepas bacterianas aisladas de tilapia *O. niloticus*.

Tabla 5. Dimensiones de los halos de inhibición (milímetros) de los discos de susceptibilidad antimicrobiana ante las cepas de *E. tarda*.

Tabla 6. Frecuencia de manifestaciones clínicas en tilapia *Oreochromis niloticus* de la cual se aisló *Edwardsiella tarda* (n = 6).

Tabla 7. Hallazgos histopatológicos en tilapia *O. niloticus* infectada por *Edwardsiella tarda* (n = 6).

Tabla 8. Características bioquímicas de la bacteria *Citrobacter freundii* aislada de tilapia *Oreochromis niloticus*.

Tabla 9. Caracterización bioquímica mediante el Sistema API 20 E de la bacteria *Citrobacter freundii* aislada de tilapia *Oreochromis niloticus*.

Tabla 10. Resistencia antibiótica *in vitro* de cepas bacterianas aisladas de tilapia *O. niloticus*.

Tabla 11. Sensibilidad antibiótica intermedia *in vitro* de cepas bacterianas aisladas de tilapia *O. niloticus*.

Tabla 12. Dimensiones de los halos de inhibición (milímetros) de los discos de susceptibilidad antimicrobiana ante las cepas de *C. freundii*.

Tabla 13. Frecuencia de manifestaciones clínicas en tilapia *Oreochromis niloticus* de la cual se aisló *Citrobacter freundii* (n = 2).

Tabla 14. Hallazgos histopatológicos en tilapia *O. niloticus* infectada por *Citrobacter freundii* (n = 2).

Tabla 15. Características bioquímicas de la bacteria *Plesiomonas shigelloides* aislada de tilapia *Oreochromis niloticus*.

Tabla 16. Caracterización bioquímica mediante el Sistema API 20 NE de la bacteria *P. shigelloides* aislada de tilapia *Oreochromis niloticus*.

Tabla 17. Dimensiones de los halos de inhibición (milímetros) de los discos de susceptibilidad antimicrobiana ante las cepas de *P. shigelloides*.

Tabla 18. Frecuencia de manifestaciones clínicas en tilapia *Oreochromis niloticus* de la cual se aisló *Plesiomonas shigelloides* (n = 5).

Tabla 19. Hallazgos histopatológicos en tilapia *O. niloticus* infectada por *Plesiomonas shigelloides* (n = 5).

Tabla 20. Características bioquímicas de la bacteria *Vibrio alginolyticus* aislada de tilapia *Oreochromis niloticus*.

Tabla 21. Caracterización bioquímica mediante Sistema API 20 NE de la bacteria *Vibrio alginolyticus* aislada de tilapia *Oreochromis niloticus*.

Tabla 22. Dimensiones de los halos de inhibición (milímetros) de los discos de susceptibilidad antimicrobiana ante la bacteria *V. alginolyticus*.

Tabla 23. Frecuencia de aparición de signos externos e internos en tilapia *Oreochromis niloticus* de la cual se aisló *Vibrio alginolyticus* (n = 1).

Tabla 24. Hallazgos histopatológicos en tilapia *O. niloticus* infectada por *Vibrio alginolyticus* (n = 1).

Tabla 25. Características bioquímicas de la bacteria *Vibrio cholerae* aislada de tilapia *Oreochromis niloticus*.

Tabla 26. Caracterización bioquímica mediante Sistema API 20 NE de la bacteria *Vibrio cholerae* aislada de tilapia *Oreochromis niloticus*.

Tabla 27. Dimensiones de los halos de inhibición (milímetros) de los discos de susceptibilidad antimicrobiana ante la bacteria *Vibrio cholerae*.

Tabla 28. Frecuencia de aparición de signos externos e internos en tilapia *Oreochromis niloticus* de la cual se aisló *Vibrio cholerae* (n = 1).

Tabla 29. Hallazgos histopatológicos en tilapia *O. niloticus* infectada por *Vibrio cholerae* (n = 1).

Tabla 30. Características bioquímicas de la bacteria *Shewanella putrefaciens* aislada de tilapia *Oreochromis niloticus*.

Tabla 31. Caracterización bioquímica mediante Sistema API 20 NE de la bacteria *Shewanella putrefaciens* aislada de tilapia *Oreochromis niloticus*.

Tabla 32. Dimensiones de los halos de inhibición (milímetros) de los discos de susceptibilidad antimicrobiana ante la bacteria *S. putrefaciens*.

Tabla 33. Frecuencia de manifestaciones clínicas en tilapia *Oreochromis niloticus* de la cual se aisló *Shewanella putrefaciens* (n = 1).

Tabla 34. Hallazgos histopatológicos en tilapia *O. niloticus* infectada por *Shewanella putrefaciens* (n = 1).

Tabla 35. Características bioquímicas de la bacteria *Shewanella algae* aislada de tilapia *Oreochromis niloticus*.

Tabla 36. Caracterización bioquímica mediante el Sistema API 20 E de la bacteria *S. algae* aislada de tilapia *O. niloticus*.

Tabla 37. Dimensiones de los halos de inhibición (milímetros) de los discos de susceptibilidad antimicrobiana ante las cepas de *S. algae*.

Tabla 38. Frecuencia de manifestaciones clínicas en tilapia *Oreochromis niloticus* de la cual se aisló *S. algae* (n = 7).

Tabla 39. Hallazgos histopatológicos en tilapia *O. niloticus* infectada por *Shewanella algae* (n = 7).

Tabla 40. Características bioquímicas de la bacteria *Aeromonas caviae* aislada de tilapia *Oreochromis niloticus*.

Tabla 41. Caracterización bioquímica mediante el Sistema API 20 NE de la bacteria *Aeromonas caviae* aislada de tilapia *Oreochromis niloticus*.

Tabla 42. Dimensiones de los halos de inhibición (milímetros) de los discos de susceptibilidad antimicrobiana ante las cepas de *A. caviae*.

Tabla 43. Frecuencia de manifestaciones clínicas en tilapia *Oreochromis niloticus* de la cual se aisló *Aeromonas caviae* (n = 5).

Tabla 44. Hallazgos histopatológicos en tilapia *O. niloticus* infectada por *Aeromonas caviae* (n = 5).

Tabla 45. Identificación molecular de bacterias patógenas aisladas de tilapias *Oreochromis niloticus*.

Tabla 46. Secuencias 16S ARNr de especies bacterianas de los géneros *Edwardsiella*, *Citrobacter*, *Plesiomonas*, *Vibrio*, *Shewanella* y *Aeromonas* incorporadas en el estudio de filogenia.

Tabla 47. Características físico químicas del agua durante el periodo de muestreo.

Tabla 48. Frecuencia de peces con síntomas de enfermedad por patógeno bacteriano según estadio de producción en tilapia *O. niloticus*.

Tabla 49. Patógenos bacterianos aislados en tilapia y rango de temperatura del agua de cultivo.

Tabla 50. Frecuencia de peces con síntomas de enfermedad por estanque de muestreo.

Tabla 51. Aislamiento de patógenos bacterianos de tilapia *O. niloticus* por estanque y fecha de muestreo.

Tabla 52. Prueba de independencia de las variables analizadas.

Tabla 53. Estado de infección en relación al peso del pez.

Tabla 54. Estado de infección de peces con respecto a la temperatura del agua.

Tabla 55. Principales rutas de transmisión de patógenos y manejo sanitario en la sala de alevinaje.

Tabla 56. Principales rutas de transmisión de patógenos y manejo sanitario en la sala de crecimiento y comercial.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Localización de la piscigranja en la provincia de Huaura.
- Figura 2.** Estanques de cultivo de tilapia revestidos con geomembrana.
- Figura 3.** Cultivo de *E. tarda* en Agar TSA evidenciando colonias de color blanco cremoso.
- Figura 4.** Cultivo de *E. tarda* en agar eosina azul de metileno mostrando colonias de color ámbar.
- Figura 5.** Bacteria *Edwardsiella tarda* fermentando y oxidando la glucosa.
- Figura 6.** Reacción de la bacteria *E. tarda* en API 20E.
- Figura 7.** Acción inhibitoria de la bacteria *E. tarda* ante los antimicrobianos frecuentemente utilizados en la actividad acuícola.
- Figura 8.** Tilapia de la etapa comercial en la cual se aprecia enrojecimiento de las aletas pectorales.
- Figura 9.** Observación histopatológica de ventrículo cardíaco con marcada pericarditis.
- Figura 10.** Riñón anterior con congestión focal de vasos sanguíneos.
- Figura 11.** Tejido hepático con granulomas.
- Figura 12.** Cultivo de *C. freundii* en agar TSA exhibiendo colonias de color blanco cremoso.
- Figura 13.** Cultivo de *C. freundii* en agar EMB mostrando colonias ámbar.
- Figura 14.** Reacción de la bacteria *C. freundii* mostrando negatividad a la prueba de Voges Proskauer (a) y positividad a rojo de metilo (b).
- Figura 15.** Reacción de la bacteria *C. freundii* en API 20E.
- Figura 16.** Frecuencia de sensibilidad antibiótica frente a las bacterias patógenas *V. alginolyticus*, *P. shigelloides*, *C. freundii* y *E. tarda* aisladas a partir de tilapias enfermas.
- Figura 17.** Cultivo de *P. shigelloides* en agar TSA mostrando colonias de color blanco cremoso.
- Figura 18.** Cultivo de *P. shigelloides* en agar EMB mostrando colonias ámbar.
- Figura 19.** *P. shigelloides* no reacciona ante la prueba de citrato.
- Figura 20.** Reacción de la bacteria *P. shigelloides* en API 20NE.
- Figura 21.** Eritema en zona pectoral y vientre.
- Figura 22.** Tejido intestinal ligeramente edematoso a nivel de la lámina propia.

Figura 23. Riñón anterior con presencia de necrosis focal en tejido hematopoyético.

Figura 24. Cultivo de *V. alginolyticus* en el medio TCBS, exhibiendo colonias sacarosa positiva.

Figura 25. Reacción positiva de *V. alginolyticus* frente a la prueba de citrato.

Figura 26. Reacción de la bacteria *Vibrio alginolyticus* en API 20 NE.

Figura 27. Cultivo de *V. cholerae* en el medio TCBS mostrando colonias de color amarillo, sacarosa positiva.

Figura 28. Frecuencia de sensibilidad antibiótica frente a las bacterias patógenas *A. caviae*, *S. algae*, *S. putrefaciens* y *V. cholerae* aisladas a partir de tilapias enfermas.

Figura 29. Necrosis focal de hepatocitos de tipo licuefactiva en tejido hepático.

Figura 30. Ligera congestión en riñón anterior.

Figura 31. Reacción negativa de *S. putrefaciens* ante la prueba de lactosa.

Figura 32. Reacción de la bacteria *Shewanella putrefaciens* en API 20 NE.

Figura 33. Riñón anterior con necrosis focal y hemorragia.

Figura 34. Necrosis de tejido espermático y congestión de vasos sanguíneos en tejido gonadal.

Figura 35. Cultivo de *S. algae* en agar tripticasa de soya exhibiendo colonias de color salmón.

Figura 36. Reacción de la bacteria *Shewanella putrefaciens* en API 20 E.

Figura 37. Severa reacción inflamatoria focal en músculo miocárdico del ventrículo cardíaco.

Figura 38. Necrosis focal de hepatocitos de tipo licuefactiva en el hígado.

Figura 39. Cultivo de *A. caviae* en agar TSA evidenciando colonias de color blanco cremoso.

Figura 40. Cultivo de *A. caviae* en agar GSP exhibiendo colonias de color amarillo.

Figura 41. Reacción positiva de *Aeromonas caviae* ante la prueba de indol.

Figura 42. Reacción de la bacteria *Aeromonas caviae* / *A. hydrophila* en API 20 NE.

Figura 43. Placa de agar mueller hinton mostrando sensibilidad antibiótica de *A. caviae* ante florfenicol y flumequina y resistencia a oxitetracilina.

Figura 44. Pericarditis focal en el ventrículo cardíaco.

Figura 45. Observación histopatológica del estómago con necrosis focal del epitelio y desprendimiento hacia la luz.

Figura 46. Amplificación de la región 16S ARNr de las cepas bacterianas de tilapia a través del método de Reacción en Cadena de la Polimerasa. La banda MM: Marcador de peso molecular; (1, 2) cepas de *E. tarda*; (9 – 13) *P. shigelloides*; (17 – 20) *S. algae*, las cuales producen amplicones de 1500 pares de bases.

Figura 47. Amplificación de la región 16S ARNr de las cepas bacterianas de tilapia a través del método de Reacción en Cadena de la Polimerasa. La banda MM: Marcador de peso molecular; (24 - 28) cepas de *A. caviae*; (7 - 8) *C. freundii* y (3 – 6) *E. tarda*, las cuales producen amplicones de 1500 pares de bases.

Figura 48. Amplificación de la región 16S ARNr de las cepas bacterianas de tilapia a través del método de Reacción en Cadena de la Polimerasa. La banda MM: Marcador de peso molecular; (14) cepa de *V. cholerae*, (15) *V. alginolyticus* y (16) *S. putrefaciens*, las cuales producen amplicones de 1500 pares de bases.

Figura 49. Árbol filogenético realizado a partir de las secuencias de ADN obtenidas de bacterias aisladas de tilapias *O. niloticus* mediante el método Neighbor - Joining con 1000 réplicas.

Figura 50. Frecuencia de peces con síntomas de enfermedad.

Figura 51. Frecuencia de peces con síntomas de enfermedad según estadio de producción.

Figura 52. Frecuencia de peces con síntomas de enfermedad con respecto a la temperatura del agua.

Figura 53. Frecuencia de peces con síntomas de enfermedad con respecto al peso del pez.

Figura 54. Diferencia entre las medias de los pesos según el estado del pez.

Figura 55. Diferencia entre las medias de las temperaturas del agua según el estado del pez.

Figura 56. Esquema de los tanques circulares en sala de alevinaje. A. Pediluvio con cal y B. Envase con alcohol gel.

Figura 57. Esquema de los estanques de la sala de crecimiento de tilapia *O. niloticus*.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADH: Arginina dihidrolasa.
- ADNr: Ácido desoxirribonucleico ribosomal.
- ADI: Ácido adípico.
- ARA: Arabinosa.
- ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal.
- BLAST: Basic Local Alignment Search Tool.
- BHIA: Agar infusion corazón cerebro.
- CAP: Ácido cáprico.
- CGE: Células granuloeosinofílicas.
- CIT: Citrato.
- CTAB: cetiltrimetilamonio bromuro.
- DTAB: dodeciltrimetilamonio bromuro.
- EDTA: Ácido etileno diamino tetraacético.
- EMB: Agar eosina azul de metileno.
- ESC: Esculina.
- F: Forward.
- GEL: Gelatina.
- GLU: Glucosa.
- GNT: Gluconato potásico.
- H₂S: Hidrógeno sulfurado.
- IND: Indol.
- Kg: Kilogramo.
- M: Molar.
- MAL: Maltosa.
- MAN: Manitol.
- MAG: N Acetil glucosamina.
- MgCl₂: Cloruro de magnesio.
- Min: Minutos.
- MLT: Ácido málico.
- mm: Milímetro.
- mM: Milimol.
- MNE: Manosa.

- μm : Micra.
- μL : Microlitro.
- μg : Microgramo.
- mL: Mililitro.
- m^3 : Metro cúbico.
- Na Cl: Cloruro de sodio.
- NCCLS: National Comitee for Clinical Laboratory Standards.
- NO_3 : Reducción de nitratos.
- OF: Oxidación – fermentación.
- OX: Oxidasa.
- PAC: Ácido fenilacético.
- PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa.
- Pb: Pares de bases.
- Ppt: Partes por trillón.
- PNPG: Beta galactosidasa.
- PRODUCE: Ministerio de la Producción.
- R: Reverse.
- Rpm: Revoluciones por minuto.
- SCAAH: Sub-committee on Aquatic Animal Health.
- t: Tonelada.
- TSA: Agar Trypticase de Soya.
- TSB: Caldo Trypticase Soya.
- TSI: Hierro tres azúcares.
- URE: Urea.
- UV: Ultra violeta.

RESUMEN

Las enfermedades bacterianas que afectan el cultivo de tilapia durante las distintas etapas productivas acuícolas pueden disminuir la producción y por ende provocar sustanciales pérdidas económicas.

El objetivo fue caracterizar molecularmente las bacterias patógenas causantes de enfermedades en cultivo intensivo cerrado de tilapia *Oreochromis niloticus* con sistema Biofloc de una piscigranja del departamento de Lima durante los años 2013, 2014 y 2015.

Se aislaron 28 cepas bacterianas de órganos internos, siendo identificadas bioquímicamente por técnicas habituales y el uso de sistemas miniaturizados API 20 E y NE. Las pruebas de sensibilidad antimicrobiana se realizaron empleando el método de Kirby-Bauer. La confirmación diagnóstica se determinó por la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) y secuenciamiento del gen 16S ARNr.

Se logró identificar y caracterizar molecularmente las cepas bacterianas siguientes: *Edwardsiella tarda* en número de seis (6), *Citrobacter freundii* (2), *Aeromonas caviae* (5), *V. cholerae* (1), *Vibrio alginolyticus* (1), *Plesiomonas shigelloides* (5), *Shewanella algae* (5) y *S. putrefaciens* (1). Se determinó el perfil filogenético de ocho especies bacterianas, las cuales se encuentran en su respectivo clado. El 100% de las cepas de *E. tarda*, *V. alginolyticus* y *V. cholerae* fueron sensibles a la totalidad de antibióticos evaluados. Algunas bacterias presentaron resistencia a oxitetraciclina y ácido nalidíxico como *C. freundii* (50%), *P. shigelloides* (80 y 60%), *S. putrefaciens* (100%) y *A. caviae* (40 y 60%).

Los signos externos frecuentemente observados en peces de las fases de crecimiento y comercial fueron: eritema en aletas pectorales, vientre y alrededor del ano, siendo provocados por *E. tarda*, *C. freundii*, *P. shigelloides*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *S. putrefaciens*, *S. algae* y *A. caviae*. Entre los signos internos se presentó el hígado congestivo cuyos agentes causales fueron *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *S. putrefaciens* y *A. caviae*.

El estudio histopatológico reveló necrosis caseosa en el ventrículo cardiaco, hígado, bazo, riñón posterior y gónadas de peces afectados por *E. tarda*. En ejemplares sintomáticos, de los cuales se aislaron *P. shigelloides* y *A. caviae* se observaron lesiones en el tracto gastrointestinal. Asimismo, en individuos

afectados por *S. putrefaciens*, *S. algae* y *V. alginolyticus* se apreció congestión de capilares sinusoides y necrosis de hepatocitos.

Existe una gran diversidad de géneros bacterianos que afectan a las tilapias bajo sistema biofloc durante la fase productiva de crecimiento y comercial.

Palabras clave: Bacterias, PCR, filogenia, sensibilidad antibiótica, histopatología, tilapia.

ABSTRACT

Bacterial diseases affect tilapia culture during different productive stages, which decrease the production and thus cause substantial economic losses.

The aim of the present study was the molecular characterization of bacterial pathogens that cause diseases on intensive tilapia culture *Oreochromis niloticus* in closed water flow with biofloc system in a fish farm from Lima region during the years 2013, 2014 and 2015.

From the cultivation of internal organs, 28 bacterial strains were isolated and characterized by usual methods as biochemical tests and miniaturized systems like API 20E and NE. The antibiotic sensitivity assays were performed using the Kirby - Bauer technique. The bacterial identification were confirmed by Polymerase Chain Reaction (PCR) and 16S ARNr gene sequencing.

Strains of *Edwardsiella tarda* (6), *Citrobacter freundii* (2), *Aeromonas caviae* (5), *Vibrio cholerae* (1), *V. alginolyticus* (1) *Plesiomonas shigelloides* (5), *Shewanella algae* (5), *S. putrefaciens* (1) were identified and molecularly characterized.

The phylogenetic profile was determine with 8 bacterial species, which are found in their respective clade. 100% of strains of *E. tarda*, *V. alginolyticus* and *V. cholerae* were sensitive to the total of the antibiotics evaluated. Some bacterias showed resistance to oxitetracycline and nalidixic acid such as *C. freundii* (50%), *P. shigelloides* (80 ad 60%), *S. putrefaciens* (100%) and *A. caviae* (40 and 60%).

The most common external sign in fishes of pre-fattening and fattening phase was: erythema in pectoral fins, belly and around the anus, provoked by *E. tarda*, *C. freundii*, *P. shigelloides*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *S. putrefaciens*, *S. algae* and *A. caviae*.

The histopathology study revealed caseous necrosis on the cardiac ventricle, liver, spleen, kidney and gonads of sick fishes by *E. tarda*. In symptomatic specimens where *P. shigelloides* and *A. caviae* were isolated, injuries in the gastrointestinal were observed. Also, sinusoid capillaries and hepatocytes necrosis, was evidenced in affected specimens by *S. putrefaciens*, *S. algae* and *V. alginolyticus*.

There is a great diversity of bacterial genera, which affect tilapias in biofloc system during pre-fattening and fattening productive phase.

Keywords: Bacterias, PCR, phylogeny, antibiotic sensitivity, histopathology, tilapia.

I. INTRODUCCIÓN

La acuicultura constituye una de las áreas con mayor expansión en la industria internacional. De acuerdo con las cifras de la FAO (2018), en el 2016 la producción de peces comestibles procedentes de la acuicultura ascendió a 80 millones de toneladas, la cual representa el 39,64% de la producción total de la pesca de captura y acuicultura.

En América del Sur la acuicultura continental únicamente se registró en Brasil (FAO, 2018).

La producción mundial de tilapia en el año 2015 alcanzó las 5'576,800 toneladas métricas, siendo China el mayor productor con 1' 800,000 t; seguido por Indonesia (1'100,000 t) y Egipto (800,000 t) (Fitzsimmons, 2016).

En nuestro país la tilapicultura es una actividad económica relevante, la cual tuvo sus inicios en el año 1970 con el cultivo de tres especies de tilapia: *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), *O. hornorum* (Trewavas, 1966) y *O. mossambica* (Peters, 1852). A partir del 2001 se impulsó la producción de esta especie con la utilización de policultivos de tilapia - langostino a nivel de investigación (MINCETUR, 2000).

En el año 2017 abasteció al mercado nacional, siendo las principales regiones productoras de esta especie: San Martín, Piura, Lima y Cajamarca. Asimismo se exportaron 147,10 toneladas métricas brutas a los Estados Unidos de América por un valor de 1'273,755 dólares (PRODUCE, 2018).

El sistema de cultivo constituye un medio propicio para la multiplicación de gran variedad de bacterias de vida libre, las cuales suelen comportarse como patógenos oportunistas, colonizando y provocando enfermedades en tilapias susceptibles, ya que su sistema inmune se encuentra mermado por la acción de factores estresantes, tales como: pobre calidad del agua, transporte, hacinamiento e inadecuada nutrición (Wedemeyer *et al.*, 1976; Dias *et al.*, 2012).

Una de las características que hizo popular el cultivo de tilapia fue la supuesta resistencia que estos peces presentaban frente a las enfermedades infecciosas (Ashiru *et al.*, 2011), constituyendo las enfermedades bacterianas la principal amenaza para los mismos (Mohanty & Sahoo, 2007). Sin embargo, actualmente dicha particularidad ha sido desacreditada por muchas referencias de brotes epizooticos, a veces devastadores en cultivos en diversas latitudes (Ariel & Owens, 1997; Perera *et al.*, 1994; Mauel *et al.*, 2007).

Entre los patógenos bacterianos que afectan con mayor frecuencia los cultivos de tilapia produciendo los mayores perjuicios económicos en ambientes dulceacuicolas, tenemos los siguientes: *Aeromonas* spp. (Shayo *et al.*, 2012), *A. hydrophila* (Conroy & Conroy, 2006), *Edwardsiella tarda* (Mohanty & Sahoo, 2007), *Flavobacterium columnare* (Roberts & Sommerville, 1982), *Francisella* spp. (Soto *et al.*, 2009), *Mycobacterium* spp. (Conroy, 2007a), *Plesiomonas shigelloides* (Cruz *et al.*, 1986; Klein *et al.*, 1993), *Pseudomonas fluorescens* (Miyasaki *et al.*, 1984), *Staphylococcus epidermidis* (Huang *et al.*, 1999), organismos de tipo *Rickettsia* (RLO) (Plumb & Hanson, 2011), *Shewanella putrefaciens* (El-Barbary, 2017), *Streptococcus agalactiae* (Conroy, 2007b, Evans *et al.*, 2006), *S. iniae* (Evans *et al.*, 2006) y *S. milleri* (Conroy, 2007b).

En la actualidad se utiliza la tecnología biofloc en sistemas de cultivo intensivos con mínimo o cero recambio de agua, formándose microorganismos que cumplen la función de mantener la calidad del agua al consumir compuestos nitrogenados, generados por las proteínas nitrogenadas del alimento y reducir la conversión alimenticia en los organismos cultivados (Crab *et al.*, 2009).

Es importante conocer la problemática sanitaria asociada a enfermedades que impactan sobre la producción durante las distintas etapas productivas en el cultivo de tilapia, ya que podrían mermar la producción de las mismas y por ende provocar sustanciales pérdidas económicas. Con el presente estudio se pretende contribuir en conocimientos sobre patologías en tilapias debido a la escasa información existente en nuestro medio en comparación con otros países vecinos; y es en este contexto que se realizó el presente trabajo.

II. ANTECEDENTES

En tilapia existen múltiples agentes bacterianos pertenecientes a distintos grupos taxonómicos que provocan serias enfermedades, siendo causadas por: *Edwardsiella tarda*, *Aeromonas* spp, *Vibrio* spp, *Plesiomonas shigelloides*, *Citobacter freundii* y *Shewanella putrefaciens* (Moreno *et al.*, 2006; Lu & Levin, 2010; Plumb & Hanson, 2011; Buller, 2014; Younes *et al.*, 2016).

Clavijo *et al.*, (2002) reportaron el primer aislamiento de *E. tarda* en 4 de 10 especímenes juveniles de tilapia roja cultivada en Venezuela.

En el 2011 se produjo un fuerte brote de Edwardsiellosis en granjas de tilapia en Colombia afectando a peces de 40 a 50 g (Iregui *et al.*, 2012).

En Turquía se reportaron elevadas mortalidades en salmón del Atlántico en el año 1991, las cuales fueron provocadas por *Aeromonas caviae*, coincidiendo con el aumento de temperatura del agua por encima de 20 °C (Candan *et al.*, 1995).

Se han registrado brotes de septicemia hemorrágica bacteriana en cultivo de ciprinidos y bagres producidos por *Aeromonas* móviles debido a estresores ambientales y durante la época de madurez sexual de los peces (Inglis *et al.*, 2001).

En Japón se ha descrito la aparición de vibriosis en ayu (*Plecoglossus altivelis*), causada por *Vibrio cholerae*, la cual ha provocado elevada mortalidad a temperaturas de agua de 21 y 26 °C (Rehulka *et al.*, 2015).

En el 2000 se presentó una epizootia generada por *V. alginolyticus* en cultivo de cobia (*Rachycentron canadum*) en jaulas flotantes en Taiwan (Rajan *et al.*, 2001).

Se registró un brote de enfermedad producido por *Plesiomonas shigelloides* en cultivo de trucha arco iris (*Salmo gairdneri*) en Portugal (Cruz *et al.*, 1986).

En 1992 se realizó el primer aislamiento de *P. shigelloides* en Alemania a partir de cinco peces cultivados como: bagre africano (*Heterobranchus bidorsalis*), esturión (*Acipenser sturio*), trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), anguila (*Anguilla anguilla*) y gourami (*Osphronemus gourami*) (Klein *et al.*, 1993).

En China, el patógeno bacteriano *Citrobacter freundii* generó significativas pérdidas económicas en granjas de anguila japonesa (*Anguilla japonica*), provocando la enfermedad de la cola (Cao *et al.*, 2016).

Se describió un brote de enfermedad en tilapias (*O. niloticus*) producida por *C. freundii* en Egipto (El-Barbary & Hal, 2017).

Entre los años 2007 y 2012 se registraron brotes de enfermedad en cultivo de carpa común (*Cyprinus carpio L*) y trucha arco iris (*O. mykiss*) causados por *Shewanella putrefaciens* (Pekala *et al.*, 2015).

En el año 2014 se reportó un caso de infección por *S. putrefaciens* en cultivo de tilapia (*O. niloticus*) en Egipto y posteriormente se reprodujo experimentalmente la enfermedad en dicha especie (El-Barbary, 2017).

La presencia de enfermedades bacterianas en cultivo de peces constituye un problema muy importante, tornándose más riesgoso cuando las prácticas de cultivo son de tipo intensivo (Habtamu & Kbede, 2016). Sin embargo, existen técnicas como el sistema biofloc que aminora el crecimiento de patógenos en el medio.

Entre los microorganismos presentes en cultivos con sistema biofloc tenemos: fitoplancton, herbívoros (rotíferos, ciliados, flagelados y copépodos) y bacterias heterótrofas, las cuales actúan sobre los patógenos, aparentemente por competencia de espacio, substrato y nutrientes esenciales como el nitrógeno, el cual es requerido por las bacterias heterótrofas y patógenas. Cabe destacar que los compuestos inhibidores excretados por los microorganismos biofloc, la intensidad de luz y fuente de carbón pueden reducir el crecimiento de los patógenos (Emerenciano *et al.*, 2009).

Existen reportes que el uso del sistema biofloc en cultivo de reproductores de tilapia, incrementa su estado inmunológico contribuyendo al mejoramiento de la robustez de la larva contra enfermedades y ante pruebas de estrés ambiental (Bossier & Ekasari, 2017). Asimismo, se ha registrado la presencia de menos ectoparásitos en branquias y epidermis en alevines de tilapia cultivados bajo tecnología biofloc con limitado intercambio de agua comparado con el sistema de intercambio convencional después de 60 días (Emerenciano *et al.*, 2009).

GENERALIDADES

2.1 TILAPIA

La tilapia fue nombrada como *Oreochromis niloticus* por Linnaeus en 1758. Es un pez oriundo de Africa que en las últimas décadas ha sido introducido en prácticamente por todas partes del mundo.

La variedad Chitralada es una de las cuatro líneas comerciales genéticamente mejoradas de tilapia. Esta variedad fue creada como un regalo al rey de Tailandia por el emperador de Japón en el año 1965, y su pureza fue mantenida en el Palacio Real de Chitralada en Bangkok. (Panorama Acuícola, 2012).

De acuerdo a su ubicación taxonómica se encuentra en el:

Phylum	:	Vertebrata
Sub phylum	:	Craneata
Clase	:	Teleostomi
Orden	:	Perciformes
Familia	:	Cichlidae
Género	:	<i>Oreochromis</i>
Especie	:	<i>O. niloticus</i>

2.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES

La tilapia es un pez que corresponde a la familia cichlidae, cuyas características externas son cuerpo comprimido con escamas cicloideas. El largo de la quijada superior no muestra dimorfismo sexual. La profundidad del pedúnculo caudal es igual a su longitud. La coloración de las aletas pectoral, dorsal y caudal adquieren una tonalidad rojiza en temporada de desove (FAO, 2005).

2.3 IMPORTANCIA DEL CULTIVO EN EL PERÚ

Las especies de tilapia del Nilo *O. niloticus*, tilapia mojarra *O. hornorum* y tilapia de Mozambique *O. mossambica* fueron introducidas en la selva alta durante la década del 70 por la Universidad Nacional Agraria La Molina y el Instituto del Mar del Perú con el propósito de investigación y cultivo, generándose una rápida adaptación de dichas especies. Asimismo, en el año 1996 se introdujo la tilapia roja *Oreochromis* spp. proveniente de Panamá (Baltazar, 2009).

Desde el 2001, en nuestro país se da la mayor importancia al cultivo de tilapia, debido a la demanda del mercado americano por su consumo, surgiendo diversas empresas (Baltazar, 2009).

La región Lima se encuentra localizada a 154 metros de altitud y posee cuerpos de agua con atributos especiales para la tilapicultura como los ríos Cañete, Mala, Chilca, Lurín, Chancay y Huaura (ANA, 2009). Esta actividad se inició en el año 2003 en la región antes mencionada y viene satisfaciendo la demanda del mercado local (PRODUCE, 2010).

En nuestro país el cultivo de tilapia se efectúa fundamentalmente en estanques de tierra y de concreto. En los últimos nueve años, la tilapicultura ha crecido significativamente a nivel nacional. En el año 2008 se cosecharon 1.714 t y en el año siguiente decreció, reportándose 1.261 t de cosecha. Durante los años consecutivos, el incremento productivo fue cada vez mayor; así, en los años 2010, 2011, 2012, 2013 y 2014 se obtuvieron producciones de 2.013; 2.423; 3.174;

3.840 y 4.610 t, respectivamente. En los años 2015 y 2016 disminuyó la producción de 3.250 a 2.950 t, para finalmente en el 2017 ascender a 3.042 t (PRODUCE, 2018).

2.4 CARACTERÍSTICAS DEL SISTEMA DE CULTIVO INTENSIVO

Lekang (2013) describió que la producción por unidad de volumen (m^3) en este tipo de sistema, es mucho mayor y se debe utilizar más tecnología e insumos artificiales para poder llevarlo a cabo.

La capacidad de carga fluctúa entre 2.500 a 10.000 kg/ha/ciclo.

Los costos de inversión por unidad de volumen cultivado serán mucho más altos que los sistemas extensivos.

Cabe destacar que el mantenimiento de condiciones óptimas de crecimiento de los peces, es necesario para alcanzar el potencial superior de desarrollo de los mismos.

El cultivo intensivo se caracteriza por proporcionar alimentación adicional, aplicar métodos de control de enfermedades y sistemas de reproducción eficaces.

El riesgo de la aparición de brotes de enfermedades es mayor que en la acuicultura extensiva, debido a que los peces se estresan continuamente para obtener su máximo rendimiento.

2.5 TECNOLOGÍA BIOFLOC

Es considerada como un sistema alternativo y eficiente, utilizado en cultivos cerrados. En dicho sistema los nutrientes pueden ser constantemente reciclados y reusados. En cuanto al enfoque sostenible del mismo, se sustenta en el crecimiento de microorganismos en el cultivo, los cuales se benefician por el mínimo o cero recambio de agua. Estos microorganismos (biofloc) mayormente cumplen dos funciones:

- Mantener la calidad del agua por el consumo de compuestos nitrogenados generados por proteínas nitrogenadas in situ.
- Incrementar la factibilidad por reducción de conversión alimenticia y disminuir los costos de alimentación.

El mínimo recambio de agua mantiene el calor y previene las fluctuaciones de temperatura de la misma, siendo utilizado en cultivo de especies tropicales en áreas frías (Crab *et al.*, 2009).

2.5.1 ROL DE LOS MICROORGANISMOS EN EL SISTEMA BIOFLOC

La materia orgánica particulada y otros microorganismos en la cadena alimenticia han sido propuestos como recursos potenciales de alimentos para los animales acuáticos. Los macroagregados (biofloc) son una proteína lipídica natural disponible las 24 horas del día. En volumen hídrico ocurre una interrelación entre el sustrato, materia orgánica y microorganismos, tales como: fitoplancton, bacterias libres y adheridas, agregados de partículas de materia orgánica y herbívoros (rotíferos, ciliados, flagelados y copépodos). Esta productividad juega un rol importante en reciclar nutrientes y mantener la calidad del agua (Mc Intosh *et al.*, 2000; Ray *et al.*, 2010).

El consumo de biofloc por langostinos o peces posee innumerables beneficios, tales como: mejorar el crecimiento, disminuir el factor de conversión y costos de alimento. Para el caso de tilapia se estima que disminuye el consumo de alimento balanceado en un 20% en comparación con los sistemas convencionales de recambio de agua (Avnimelech *et al.*, 1994).

En cuanto a la mantención de la calidad del agua, se efectúa mediante el control de la comunidad bacteriana sobre los microorganismos autotróficos, la cual se consigue utilizando una elevada proporción de carbono y nitrógeno (C:N). Los productos nitrogenados son fácilmente utilizados por las bacterias heterótrofas, siendo usados para su crecimiento y producción de nuevas células microbianas (Avnimelech, 1999).

Las bacterias y otros organismos actúan eficientemente como sistemas bioquímicos que degradan y metabolizan residuos orgánicos, siendo recicladores de nutrientes en forma de materia orgánica e inorgánica (alimento no consumido y digerido, residuos metabólicos y fuentes de carbono usado como fertilizante) y produciendo nuevas células microbianas (Avnimelech, 1999).

Las fuentes de carbono usadas en un sistema biofloc son productos derivados de la industria alimentaria de consumo humano y animal, siendo origen de carbohidratos como el trigo, melaza, maíz y tapioca (Emerenciano *et al.*, 2013).

2.5.2 EFECTO PROBIÓTICO NATURAL DE BIOFLOC

El sistema biofloc constituye una nueva estrategia de manejo de enfermedades en contraste con los enfoques convencionales, tales como la aplicación de antibióticos, antifúngicos, probióticos y prebióticos. El efecto probiótico natural de este sistema puede actuar externamente contra *Vibrio* sp. y ectoparásitos. El mecanismo de trabajo de los microorganismos biofloc contra patógenos, aparentemente se da por competencia de espacio, substrato y nutrientes como el nitrógeno, el cual es requerido por las bacterias heterótrofas y patógenas. Cabe destacar que los compuestos inhibidores que son excretados por los microorganismos biofloc, la intensidad de luz y fuente de carbón pueden reducir el crecimiento de los patógenos (Emerenciano *et al.*, 2009).

Existen reportes que el uso del sistema biofloc en cultivo de reproductores de tilapia, incrementa su estado inmunológico contribuyendo al mejoramiento de la robustez de la larva contra enfermedades y ante pruebas de estrés ambiental (Bossier & Ekasari, 2017). Asimismo, se ha registrado la presencia de menos ectoparásitos en branquias y epidermis en alevines de tilapia cultivados bajo tecnología biofloc con limitado intercambio de agua comparado con el sistema de intercambio convencional después de 60 días (Emerenciano *et al.*, 2013).

El crecimiento de los peces en sistema biofloc adquieren buena resistencia bacteriana en comparación de aquellos que crecen en un sistema convencional de intercambio de agua (Jeney, 2017).

2.6 ENFERMEDADES BACTERIANAS EN TILAPIA

Las enfermedades bacterianas en peces son principalmente provocadas por bacterias Gram negativas, las cuales actúan como patógenos oportunistas responsables de procesos patológicos en especies susceptibles (Monrás *et al.*, 2003). En este contexto consideraremos la acción patógena de dichas bacterias sobre el cultivo de tilapia.

2.6.1 EDWARDSIELLOSIS

AGENTE CAUSAL:

La bacteria *E. tarda* es un bacilo corto, Gram negativo, móvil que pertenece a la familia Enterobacteriaceae (Zhou *et al.*, 2014; El-Seedy *et al.*, 2015) y cuyas dimensiones aproximadamente son 1 micra de diámetro y de 2-3 micras de longitud, posee flagelos peritricos que le permite movilizarse (Inglis *et al.*, 2001; Austin & Austin, 2007). Sin embargo, existen algunos reportes de cepas no motiles aisladas de pargo japonés (*Pagrus major*) y medregal japonés (*Seriola quinqueradiata*) (Park *et al.*, 2012).

Existen cuatro serotipos diferentes (A, B, C y D) que fueron aislados a partir de anguila y lenguado en Japón. De todos los serotipos anteriormente mencionados, el A es altamente virulento y predominante (Park *et al.*, 1983; Rashid *et al.*, 1994).

EPIDEMIOLOGÍA

HOSPEDADORES

Si bien *E. tarda* afecta a tilapia (*Tilapia nilotica*), también se han reportado brotes de enfermedad en poblaciones de carpa común (*Cyprinus carpio*) (Sae-Oui *et al.*, 1984), carpa catla (*Gibelion catla*), rohu (*Labeo rohita*) (Park *et al.*, 2012), bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) (Meyer & Bullock, 1973), salmón real (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Amandi *et al.*, 1982), trucha fontana (*Salvelinus*

fontinalis) (Uhland *et al.*, 2000), barramundi (*Lates calcifer*), perca americana (*Micropterus salmoides*) y pez gato africano (*Clarias batrachus*) (Park *et al.*, 2012).

En muchas especies de peces marinos se ha descrito la infección producida por esta bacteria, entre las cuales figuran: lisa (*Mugil cephalus*) lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*), pargo japonés (*Pagrus major*), medregal del Japón (*Seriola quinqueradiata*), lubina (*Dicentrarchus labrax*), anguila europea (*Anguilla anguilla*) y anguila japonesa (*Anguilla japonica*) (Kusuda *et al.*, 1976; Nakatsugawa *et al.*, 1983; Park *et al.*, 2012).

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA PRESENTACIÓN DE LA ENFERMEDAD

La bacteria *E. tarda* es un patógeno oportunista capaz de sobrevivir fuera del hospedero, en el agua de estanques y sedimento. Dicho patógeno puede provocar brotes de enfermedad debido a la presencia de estresores ambientales como: elevada temperatura y deficiente calidad del agua, alta concentración de materia orgánica, densidades poblacionales elevadas y fluctuaciones del oxígeno disuelto (Park *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2014; El Deen Aie *et al.*, 2017).

PERIODO DE INCUBACIÓN

Se encuentra relacionado con la temperatura del agua y en condiciones de experimentación el tiempo de incubación es de 10 días post infección a una temperatura de 27 °C, presentándose mortalidad del bagre de canal (*Ictalurus punctatus*). Asimismo, se realizaron estudios en lubina negra (*Morone saxatilis*) mantenida a 27 °C, la cual presentó mortandad durante las 72 horas después de haber sido infectada por baños de inmersión (Bullock, 1985).

TRANSMISIÓN

Las bacterias se difunden horizontalmente de un pez a otro por medio del agua, siendo expuestos los animales sanos a patógenos oportunistas excretados por peces enfermos a través de sus heces (Matzuoka, 2004).

Los mamíferos, aves, reptiles, peces y anfibios pueden actuar como vectores potenciales de la enfermedad (Janda & Abbott, 1993).

PATOGÉNESIS

Existe poco conocimiento acerca de los mecanismos que utiliza la bacteria *E. tarda* para adherirse e invadir al hospedero. Sin embargo, diversos autores (Janda *et al.*, 1991; Ling *et al.*, 2000) han reportado los sitios más comunes de penetración del patógeno como el intestino y abrasiones en piel.

SIGNOS DE LA ENFERMEDAD

El comportamiento de los peces fueron letargia y movimientos en espiral (Mohanty & Sahoo, 2007; El Deen Aie *et al.*, 2017).

SIGNOS EXTERNOS:

Entre los signos característicos reportados en tilapia tenemos: exoftalmia (Miyazaki & Kaige, 1985; El Deen Aie *et al.*, 2017), congestión y hemorragias petequiales en la boca, base de las aletas, opérculo y vientre (El-Seedy *et al.*, 2015; El Deen Aie *et al.*, 2017), pedúnculo caudal con áreas necróticas (El Deen Aie *et al.*, 2017), distensión abdominal por la acumulación de líquido ascítico (El-Yazeed & Ibrahim, 2009; El-Seedy *et al.*, 2015), hinchazón (Mohanty & Sahoo, 2007; Park *et al.*, 2012) y sangrado del ano enrojecido (Mohanty & Sahoo, 2007).

SIGNOS INTERNOS:

Puede haber presencia de ascitis de color amarillenta en la cavidad abdominal (El-Yazeed & Ibrahim, 2009; El-Seedy *et al.*, 2015). Sin embargo, otros autores (El Deen Aie *et al.*, 2017) describen líquido ascítico sanguinolento.

Otro aspecto patológico es el hallazgo de lesiones nodulares en el hígado, bazo, riñón, intestino (Miyazaki & Kaige, 1985; El-Yazeed & Ibrahim, 2009) y dentro del músculo de los flancos (Mohanty & Sahoo, 2007). El hígado, bazo y

riñón pueden encontrarse congestionados (El-Seedy *et al.*, 2015; El Deen Aie *et al.*, 2017) y la vejiga natatoria distendida (El-Yazeed & Ibrahim, 2009; El Deen Aie *et al.*, 2017).

El-Yazeed & Ibrahim (2009) reportan esplenomegalia y congestión, así como presencia de severa enteritis hemorrágica.

DIAGNÓSTICO Y DETECCIÓN

La edwardsiellosis por ser una entidad patológica de tipo granulomatosa exhibe signos similares a infecciones producidas por las bacterias *Francisella* sp., *Staphylococcus epidermidis*, *Mycobacterium* sp., *Streptococcus* sp. (Conroy, 2009), *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum* y *Pseudomonas anguilliseptica* (Park *et al.*, 2012). Por lo tanto, el diagnóstico de esta enfermedad no se establece exclusivamente con la observación de signos clínicos, sino que debe ser complementado con el aislamiento de *E. tarda* a partir de bazo, hígado o riñón anterior (Austin & Austin, 2007).

El cultivo bacteriano se puede efectuar en agar tripticasa de soya (TSA) y agar infusión cerebro corazón (BHIA) con incubaciones de 25 - 37° C durante 24 horas (Starliper, 2008; Habtamu & Kebede, 2016).

Para la obtención de los perfiles bioquímicos de este patógeno, se realiza mediante técnicas habitualmente utilizadas y nuevos métodos como el kit miniaturizado API 20 E (El-Seedy *et al.*, 2015; El Deen Aie *et al.*, 2017).

Bioquímicamente *E. tarda* se describe como una bacteria fermentadora, positiva a las pruebas de citrato de Simmons (Najiah *et al.*, 2006; El-Yazeed & Ibrahim, 2009), catalasa, rojo de metilo, descarboxilación de ornitina y lisina, producción de hidrógeno sulfurado, indol y ácido a partir de glucosa y maltosa. Sin embargo, presenta reacción negativa ante las pruebas de citocromo oxidasa, Voges Proskauer, arginina dehidrolasa, urea, lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol, arabinosa, rhamnosa, xilosa (Najiah *et al.*, 2006; El-Seedy *et al.*, 2015), manosa, melobiosa (Najiah *et al.*, 2006) inositol y betagalactosidasa (El-Seedy *et al.*, 2015).

Cabe destacar que algunos autores describen variabilidad ante la prueba de citrato (El-Seedy *et al.*, 2015; Habtame & Kebede, 2016; El Deen Aie *et al.*, 2017), producción de hidrógeno sulfurado (Park *et al.*, 2012), indol (Habtame & Kebede, 2016), fermentación de manitol, arabinosa (Park *et al.*, 2012), rhamnosa, xilosa e inositol (Habtame & Kebede, 2016).

La confirmación diagnóstica de la bacteria *E. tarda* se lleva a cabo con la utilización de antisueros específicos mediante pruebas de aglutinación y ELISA (Mohanty & Sahoo, 2007). Asimismo, actualmente se usan los métodos moleculares como la Reacción en Cadena de la Polímera (PCR) (Park *et al.*, 2012; El Deen Aie *et al.*, 2017), Amplificación Isotérmica de Ácidos Nucleicos (LAMP) e Hibridación Fluorescente in situ (FISH), siendo considerados métodos rápidos y sensibles (Mohanty & Sahoo, 2007).

SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA

Las cepas bacterianas de *E. tarda* pueden exhibir susceptibilidad antimicrobiana frente a los antibióticos: florfenicol (Zhou *et al.*, 2014; El Deen Aie *et al.*, 2017), flumequina (Castro, 2011; Nadirah *et al.*, 2012), sulfatrimetoprim (Castro, 2011), oxitetraciclina (Mohanty & Sahoo, 2007; Castro, 2011), kanamicina (Lee *et al.*, 2011; Nadirah *et al.*, 2012), gentamicina (Zhou *et al.*, 2014) y ácido nalidíxico (Lee *et al.*, 2011). Asimismo, pueden ofrecer resistencia a oxitetraciclina y kanamicina (Yu *et al.*, 2009).

HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS

Iregui *et al.* (2012) describieron cuadros histopatológicos que presenta la edwardsiellosis, los cuales incluyen a nivel de tejido cerebral meningitis necrótica, encefalitis y vasculitis con necrosis fibrinoide de las paredes de los vasos sanguíneos.

Mohanty & Sahoo (2007) y El Deen Aie *et al.* (2017) observaron necrosis en el filamento y lamelas branquiales, así como hiperplasia de células epiteliales de las lamelas secundarias con infiltración de macrófagos.

También se describió en el hígado, degeneración hidrópica con hepatocitos hinchados, vacuolas irregulares en el citoplasma y presencia de cambios de grasa. Asimismo, a nivel de la vena central se observó congestión (El Deen Aie *et al.*, 2017).

En tejido esplénico, las pulpas se visualizaron hiperémicas (Mohanty & Sahoo, 2007; El Deen Aie *et al.*, 2017), encontrándose incrementados los centros de melanomacrófagos con hemosiderosis y depleción de esplenocitos (El Deen Aie *et al.*, 2017).

El Deen Aie *et al.* (2017) apreciaron degeneración vacuolar de las células epiteliales de los túbulos renales acompañada de degeneración nuclear y necrosis.

Pirarat (2007) observó poliserositis aguda, peritonitis, perihepatitis, periesplenitis, peripancreatitis y pericarditis acompañada con células mononucleares fagocíticas. Asimismo, Mohanty & Sahoo (2007) describieron nefritis supurativa intersticial y hepatitis supurativa.

Cabe señalar que en algunas lesiones inflamatorias muchos macrófagos sufren degeneración nuclear y multiplicación bacteriana dentro de sus células. Posteriormente, al progresar la infección las células epiteliales se organizan fuera del tejido afectado junto con las células inflamatorias y bacterias. Dicho tejido organizado forma los granulomas en el hígado, bazo, riñón (Miyazaki & Kaige, 1985).

Mohanty & Sahoo (2007) describieron necrosis de tipo licuefactiva, invasión bacteriana e infiltración de macrófagos, los cuales se encuentran fagocitando al patógeno en los órganos antes mencionados.

2.6.2 CITROBACTERIOSIS

AGENTE CAUSAL:

La bacteria *Citrobacter freundii* es un bacilo Gram negativo que pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Mide aproximadamente 0,5 - 2 µm de largo y posee uno a dos flagelos polares que le confieren motilidad (Cong *et al.*, 2011; Benites de Padua *et al.*, 2014).

EPIDEMIOLOGÍA

HOSPEDADORES

La citrobacteriosis ha sido reportada en tilapia (*Oreochromis niloticus*) (El-Barbary & Hal, 2017). Sin embargo, se han descrito brotes de enfermedad en poblaciones de ciprinidos como carpa común (*Cyprinus carpio*) y carpín común (*Carassius carassius*); así como en otras especies ícticas no ciprinidas como: trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (El-Barbary & Hal, 2017), salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (Svetlana *et al.*, 2003), salmón sakura (*Oncorhynchus masou*) (Öztürk & Altinok, 2014), bagre brasileiro nativo (*Pseudoplatystoma*), pez luna (*mola mola*), pez doctor (*garra rufa obtusa*), doncella (*Pseudoplatystoma reticulatum*) (Benites de Padua *et al.*, 2014), lisa (*Mugil capito*) (Hassan *et al.*, 2012), esturión (*Acipenser schrenckii*) y anguila japonesa (*Anguilla japonica*) (Cao *et al.*, 2016). Asimismo, se ha presentado en otros hospederos como crustáceos, anfibios, reptiles, aves y mamíferos (Benites de Padua *et al.*, 2014).

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA PRESENTACIÓN DE LA ENFERMEDAD

La infección provocada por la bacteria *C. freundii* se relaciona a periodos de elevada temperatura del agua, pobre calidad del ambiente y factores de estrés que comprometen la defensa orgánica del animal (Benites de Padua *et al.*, 2014).

OCURRENCIA DE BROTES

En trabajos experimentales realizados con ciprinidos y trucha arco iris, a los cuales se les inyectó 10^7 UFC/ml, se presentó mortalidad a una temperatura del agua de 11 °C y 10 °C, respectivamente (Svetlana *et al.*, 2003).

SIGNOS DE LA ENFERMEDAD

SIGNOS EXTERNOS:

En tilapias enfermas se manifiestan signos de exoftalmia, erosión de las aletas, presencia de hemorragias en la corporal hemorrágica y úlceras profundas en la piel (Thanigaivel *et al.*, 2015; El-Barbary & Hal, 2017).

En otras especies de peces se ha descrito coloración oscura, erosión, descamación y sangrado difuso en piel y aletas (Svetlana *et al.*, 2003; Benites de Padua *et al.*, 2014), así como descarga sanguinolenta a través del ano (Svetlana *et al.*, 2003).

SIGNOS INTERNOS:

Los signos característicos en tilapia son presencia de intestino graso, congestión en hígado, bazo, riñón y vejiga natatoria (El-Barbary & Hal, 2017).

En otras especies se observa hemopericardio, hemorragia en el encéfalo (Benites de Padua *et al.*, 2014), pared interna de la vejiga natatoria, gónadas, intestino, músculo, riñón e hígado (Svetlana *et al.*, 2003). El bazo se presenta alargado, la pared intestinal edematosa con el lumen expandido debido a la presencia de fluido sanguinolento, provocando olor fétido (Svetlana *et al.*, 2003; Benites de Padua *et al.*, 2014).

DIAGNÓSTICO Y DETECCIÓN

La citrobacteriosis presenta signos clínicos semejantes a diversas infecciones bacterianas provocadas por los patógenos bacterianos *E. tarda*, *V. cholerae*, *V. alginolyticus*, *S. putrefaciens* y *A. caviae* (Austin & Austin, 2007). Por lo tanto, el diagnóstico de esta entidad patológica no se puede sustentar exclusivamente con la visualización de signos clínicos, sino que debe ser complementado con el aislamiento de *C. freundii*.

El cultivo bacteriano puede efectuarse en el medio TSA y agar infusión cerebro corazón (BHIA), siendo la temperatura de incubación de 25 a 37° C durante 24 a 48 horas (Austin & Austin, 2007).

Para caracterizar bioquímicamente este patógeno se usan métodos habituales y otras técnicas como el Sistema miniaturizado API-20E (Svetlana *et al.*, 2003; Benites de Padua *et al.*, 2014).

Bioquímicamente *C. freundii* es una bacteria metabólicamente fermentativa, positiva a las pruebas de catalasa, beta galactosidasa (Benites de Padua *et al.*, 2014), citrato (Cao *et al.*, 2016; El-Barbary & Hal, 2017), producción de hidrógeno sulfurado, ácido a partir de arabinosa (Benites de Padua *et al.*, 2014; Cao *et al.*, 2016), amigdalina (Austin *et al.*, 1992; Svetlana *et al.*, 2003), glucosa, manitol y sorbitol. No obstante, resulta negativa ante las pruebas de citocromo oxidasa, triptófano desaminasa, ureasa, producción de indol, lisina descarboxilasa, inositol (Benites de Padua *et al.*, 2014; Cao *et al.*, 2016; El-Barbary & Hal, 2017), Voges Proskauer (Benites de Padua *et al.*, 2014) y citrato (Austin *et al.*, 1992; Svetlana *et al.*, 2003). Asimismo, se ha registrado variabilidad en algunas pruebas como producción de gelatinasa, ácido a partir de amigdalina (Benites de Padua *et al.*, 2014) sacarosa y melobiosa; así como descarboxilación de ornitina (Svetlana *et al.*, 2003).

La confirmación diagnóstica de la bacteria *C. freundii* se efectúa utilizando técnicas serológicas a través de la prueba de aglutinación en placas, inmunoblot y análisis de lipopolisacáridos (Toranzo *et al.*, 1994). Asimismo, se usan métodos

moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimera (PCR) (El-Barbary & Hal, 2017).

SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA

Las cepas de *C. freundii* pueden presentar sensibilidad antimicrobiana a distintos antibióticos, tales como: flumequina, oxitetraciclina, sulfonamidas (Svetlana *et al.*, 2003), ácido nalidíxico (El-Barbary *et al.*, 2017) y gentamicina (Cao *et al.*, 2016). No obstante, otros estudios señalan resistencia a oxitetraciclina, kanamicina, ácido oxolínico y sulfatrimetoprim (Toranzo *et al.*, 1994).

HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS

El-Barbary & Hal (2017) y Thanigaivel *et al.* (2015) describieron los daños tisulares que se presentan en la citrobacteriosis en diferentes órganos afectados como hiperplasia del epitelio branquial, aneurismas con evidente edema del epitelio intersticial y destrucción de las lamelas primarias y secundarias. Asimismo, registraron cambios en el hígado como degeneración grasa, leve hemorragia, severa dilatación de capilares sinusoides y ausencia de células de Kupffer.

A nivel del riñón posterior se apreció hemorragia leve, lumen de los túbulos completamente vacíos, dilatación del espacio de Bowman e infiltración de células mononucleares perivascularres e interlobulillar (El-Barbary & Hal, 2017).

2.6.3 ENFERMEDAD PRODUCIDA POR *Plesiomonas shigelloides*

AGENTE CAUSAL:

La bacteria *Plesiomonas shigelloides* es un bacilo Gram negativo, no productor de esporas, anaerobio facultativo que pertenece a la familia Enterobacteriaceae y cuyas dimensiones aproximadas son 0,3 - 1,0 μm de diámetro y 0,6 - 6,0 μm de largo (Woo *et al.*, 2011), presenta flagelos de tipo

lofotricos y peritricos, los cuales le permiten moverse (Jagger, 2000; Moreno *et al.*, 2006).

Existen principalmente dos esquemas de serotipificación, de los cuales uno de ellos fue propuesto por Shimada & Sakazaki y consistió en 40 serovariantes. El segundo esquema fue planteado en 1968 por Aldova & Geizer, quienes identificaron 13 antígenos “O” y 15 “H”. Posteriormente nuevas serovariantes han sido adicionadas a ambos esquemas hasta que finalmente se creó un esquema internacional unificado mediante la incorporación de los esquemas de Shimada – Sakazaki y Aldova. Por el momento se han reconocido 102 antígenos somáticos y 51 flagelares. Sin embargo, la mayor parte de cepas utilizadas en los estudios anteriormente citados provienen de casos clínicos de humanos y de animales homeotermos (González-Rey, 2003).

Schubert & Pelz (1993) elaboraron otro esquema antigénico que consistió en 23 antígenos “O” y 5 “H”, los cuales fueron aislados de agua de estanques y de insectos. Sin embargo, dicho esquema ambiental no ha sido incorporado en el internacional (González-Rey, 2003).

EPIDEMIOLOGÍA

HOSPEDADORES

La enfermedad producida por la bacteria *P. shigelloides* ha sido descrita en brotes de poblaciones de tilapia (*O. mossambicus*) (Moreno *et al.*, 2006); sin embargo, Klein *et al.*, (1993) y Cruz *et al.*, (1986) reportaron dicha entidad patológica en otras especies de peces de agua dulce como trucha arco iris (*Salmo gairdneri*), bagre africano (*Heterobranchus bidorsalis*), esturión (*Acipenser sturio*), gourami (*Osphronemus gourami*), guppies (*Poecilia reticulata*) y pez lengüihueso malayo (*Scleropages formosus*). Otros autores (Klein *et al.*, 1993) registraron la enfermedad en algunas especies marinas como anguila (*Anguilla anguilla*).

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA PRESENTACIÓN DE LA ENFERMEDAD

Existen factores desencadenantes de estrés que se encuentran relacionados con la aparición de brotes de enfermedad, tales como: inadecuada manipulación de los peces, deficiente limpieza y abundante materia orgánica en los estanques, así como aumento súbito de la temperatura del agua (Cruz *et al.*, 1986).

Cabe destacar que se presentan elevadas mortalidades al final de primavera y a comienzo del verano (Cruz *et al.*, 1986).

OCURRENCIA DE BROTES

Los brotes de esta entidad patológica son variables, habiéndose registrado mortalidades de 5 a 100% en alevines de bagre africano (*Heterobranchus bidorsalis*) y esturión (*Acipenser sturio*) después de haber sido transportados y por ende sometidos a situaciones de estrés (Klein *et al.*, 1993).

La mortalidad en trucha (*Salmo gairdneri*) provocada por esta bacteria se estimó en 2,000 especímenes por día, lo cual representa el 40% de la población (Cruz *et al.*, 1986).

SIGNOS DE LA ENFERMEDAD

SIGNOS EXTERNOS:

Las tilapias afectadas presentan melanosis del cuerpo, hemorragias en la superficie, desprendimiento de escamas y aletas carcomidas (Liu *et al.*, 2015).

En otras especies se registra anorexia, pérdida de peso, ano prominente (Woo *et al.*, 2011; Öztürk & Altinok, 2014) a veces enrojecido con exudado amarillento (Cruz *et al.*, 1986).

SIGNOS INTERNOS:

En tilapia se observa el hígado pálido, bazo oscuro rojizo, vejiga natatoria dilatada y fluido ascítico en la cavidad abdominal (Liu *et al.*, 2015).

Se han descrito en otras especies de peces los siguientes signos: hemorragias petequiales en paredes internas de la cavidad visceral, ascitis moderada (Cruz *et al.*, 1986) con fluido amarillento, hemorragia ventricular (Woo *et al.*, 2011), enteritis catarral hemorrágica y edema renal (Jagger, 2000; Nadirah *et al.*, 2012).

DIAGNÓSTICO Y DETECCIÓN

Esta enfermedad manifiesta signos parecidos a infecciones generadas por la bacteria *E. tarda* (Austin & Austin, 2007). Por ello, el diagnóstico de esta patología no puede sustentarse únicamente en la observación de signos clínicos, debiendo ser complementado con el aislamiento e identificación de *P. shigelloides*.

El cultivo bacteriano puede efectuarse en el medio tripticasa de soya a una temperatura de incubación de 22 a 37 °C durante 24 horas (Cruz *et al.*, 1986), en donde las colonias crecen redondas, lisas, discretamente convexas de bordes regulares y coloración blanca amarillenta. Asimismo, crecen en medios de cultivo para bacterias entéricas, tales como: MacConkey, agar Salmonella-shigella (SS), agar deoxicolato citrato (DC), entre otros (González-Rey, 2003).

Respecto a la caracterización bioquímica de esta bacteria se usan técnicas convencionales y nuevos métodos diagnósticos como los Sistemas API-20E (Cruz *et al.*, 1986) y API-20 NE (Klein *et al.*, 1993).

Bioquímicamente la bacteria *P. shigelloides* se caracteriza por ser un grupo homogéneo, metabólicamente fermentativa que reacciona positivamente ante a las pruebas de citocromo oxidasa, producción de indol y ácido a partir de glucosa e inositol, descarboxilación de lisina y ornitina, arginina dihidrolasa (Klein *et al.*, 1993; Inglis *et al.*, 2001; González-Rey, 2003; Janda *et al.*, 2016) y rojo de metilo

(Klein *et al.*, 1993). No obstante, resulta negativa a las pruebas de Voges-Proskauer (Inglis *et al.*, 2001; Janda *et al.*, 2016), citrato de Simmons, producción de ureasa, gelatinasa, hidrógeno sulfurado y ácido a partir de manitol, sacarosa, sorbitol, arabinosa (Klein *et al.*, 1993; Inglis *et al.*, 2001; Gonzáles-Rey, 2003), rhamnosa (Klein *et al.*, 1993; Gonzáles-Rey, 2003) y melobiosa (Gonzáles-Rey, 2003). Por otra parte, se ha descrito variabilidad en algunas pruebas como lactosa y salicina (Janda *et al.*, 2016).

La confirmación diagnóstica se realiza mediante el uso de técnicas moleculares, tal como la PCR (Polymerase chain reaction) (Moreno *et al.*, 2006; Nisha *et al.*, 2014).

SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA

Las cepas bacterianas de *P. shiguelloides* pueden evidenciar susceptibilidad antimicrobiana a diferentes antibióticos como las quinolonas, ácido nalidixico (Cruz *et al.*, 1986; Jagger, 2000) y gentamicina (Woo *et al.*, 2011). Asimismo, pueden ofrecer resistencia a oxitetraciclina (Nadirah *et al.*, 2012) y sulfatrimetoprim (Woo *et al.*, 2011).

HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS

No se han reportado casos de lesiones en tilapia. Sin embargo, Cruz *et al.* (1986) han descrito en otras especies como trucha arco iris (*Salmo gairdneri*) la presencia de necrosis focal de hepatocitos; y a nivel de tejido renal, la vacuolización y picnosis de células epiteliales en los túbulos e incremento anormal de melanina en tejido hematopoyético.

2.6.4 VIBRIOSIS

a) AGENTE CAUSAL:

La bacteria *V. alginolyticus* es un bastón, Gram negativo, perteneciente a la familia Vibrionaceae y presenta motilidad (Krupesha sharma *et al.*, 2013). Este

organismo abunda en ecosistemas marinos y estuarinos (Austin & Austin, 2007; Chatterjee & Haldar, 2012).

EPIDEMIOLOGÍA

HOSPEDADORES

Esta entidad patológica ha sido reportada en tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) de agua salobre. Asimismo en peces anandromos como esturión siberiano (*Acipenser baerii*) (Younes *et al.*, 2016) y marinos entre los cuales figuran: sargo dorado (*Rhabdosargus sarba*), pargo de cabeza negra (*Acanthopagrus schlegelii*) (Younes *et al.*, 2016), seabream (*Sparus aurata*), cobia (*Rachycentron canadum*), grouper (*Epinephelus malabaricus*), lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Krupesha sharma *et al.*, 2013), falso halibut del Japón (*Paralichthys olivaceus*), rocote negro (*Sebastes melanops*) (Oh *et al.*, 2011) y caballito de mar (*Hippocampus reidi*) (Martins *et al.*, 2010).

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA PRESENTACIÓN DE LA ENFERMEDAD

La susceptibilidad de los peces a la vibriosis aumenta cuando los animales están sujetos a condiciones de estrés, tales como: manipulación y transporte, daños físicos, elevada densidad poblacional, aumento de la temperatura, pH, disminución del oxígeno disuelto, fuerte incremento de amonio y variación de la salinidad del agua (Sonia & Lipton, 2012; Krupesha sharma *et al.*, 2013; Younes *et al.*, 2016).

OCURRENCIA DE BROTES

En cultivo de cobia en jaulas flotantes se presentó mortalidad acumulada de 30% durante tres semanas (Rajan *et al.*, 2001).

TRANSMISIÓN GENERAL

La infección inicial es a través del agua. Una vez establecida en los peces, la enfermedad probablemente se disemina por contacto (Bullock, 1977).

PATOGENESIS GENERAL

Krupesha sharma *et al.* (2013) sugieren que la entrada del patógeno se da por la ingestión oral, infecciones a través de lesiones en piel y superficie de las branquias.

SIGNOS DE LA ENFERMEDAD

En tilapias enfermas se describen cambios en el comportamiento como letargia y movimientos giratorios (Sonia & Lipton, 2012).

SIGNOS EXTERNOS:

Los peces presentan despigmentación de la piel, presencia de puntos hemorrágicos en la base de la cola y hocico (Younes *et al.*, 2016).

En otras especies se han reportado erosión y palidez de las lamelas branquiales (Rajan *et al.*, 2001), úlceras con exposición del músculo (Balebona *et al.*, 1998; Krupesha sharma *et al.*, 2013) y abdomen distendido (Austin *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 2004).

SIGNOS INTERNOS:

Se ha descrito en tilapia congestión en bazo y estómago (Younes *et al.*, 2016).

Se han registrado en otras especies de peces los siguientes signos: congestión de cerebro (Krupesha sharma *et al.*, 2013), hígado (Balebona *et al.*, 1998) y riñón (Krupesha sharma *et al.*, 2013), así como intestino edematoso

(Austin *et al.*, 1993) y acumulación de fluido en la cavidad peritoneal (Rajan *et al.*, 2001).

DIAGNÓSTICO Y DETECCIÓN

La vibriosis es una enfermedad septicémica (Balebona *et al.*, 1998) que exhibe signos clínicos similares a infecciones provocadas por otros patógenos como *E. tarda*, *S. putrefaciens*, *A. caviae*, *C. freundii* y *V. cholerae*. (Austin & Austin, 2007). Por consiguiente, el diagnóstico de esta entidad patológica no puede sustentarse únicamente en la visualización de signos clínicos, debiendo complementarse con el aislamiento e identificación de *V. alginolyticus*.

El cultivo bacteriano se puede realizar en TSA (Zorrilla *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004) con incubaciones de 22 a 37 °C durante 18 a 24 horas (Krupesha sharma *et al.*, 2013; Younes *et al.*, 2016) en donde las colonias crecen redondas, de bordes regulares, color blanco grisácea, cremoso y presentan crecimiento en swarming. Asimismo, las colonias bacterianas pueden crecer en agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) de color amarillo (Sonia & Lipton, 2012).

Para la obtención de los perfiles bioquímicos de este patógeno se emplean metodologías convencionales y otras técnicas como el kit de diagnóstico miniaturizado API 20 NE (Abdallah *et al.*, 2009; Younes *et al.*, 2016).

Bioquímicamente es una bacteria que presenta metabolismo fermentativo, produce ácido a partir de manitol, glucosa y sacarosa. Reacciona positivamente a las pruebas de citocromo oxidasa, lisina descarboxilasa, indol, citrato y Voges Proskauer, tales hallazgos son consignados por distintos autores como Rajan *et al.*, (2001); Zorrilla *et al.*, (2003) y Liu *et al.*, (2004). No obstante, es negativa ante las pruebas de producción de hidrógeno sulfurado, arginina dehidrolasa, inositol y arabinosa (Zorrilla *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; Younes *et al.*, 2016). Por otro lado, se han registrado reacciones variables en algunas pruebas como producción de indol y asimilación de manitol (Younes *et al.*, 2016).

Existen otros reportes sobre la reacción negativa de la bacteria ante las pruebas de citrato (Krupesha sharma *et al.*, 2013; Younes *et al.*, 2016) y Voges Proskauer (Rajan *et al.*, 2001; Sonia & Lipton, 2012); y positividad a la producción de hidrógeno sulfurado (Krupesha sharma *et al.*, 2013; Sonia & Lipton, 2012).

En cuanto a la tolerancia bacteriana al cloruro de sodio, presenta crecimiento en medios de cultivo con 0.5 a 9.5% de sal, siendo halófila (Rajan *et al.*, 2001; Zorrilla *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; Krupesha sharma *et al.*, 2013).

La bacteria presenta sensibilidad ante el agente vibriostático (O/129) (Sonia & Lipton, 2012; Younes *et al.*, 2016).

El diagnóstico confirmativo se efectúa mediante el empleo de técnicas moleculares, tal como la PCR (Polymerase chain reaction) (Krupesha Sharma *et al.*, 2013).

SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA

Las cepas bacterianas de *V. alginolyticus* pueden revelar susceptibilidad ante diferentes antibióticos como oxitetraciclina (Sonia & Lipton, 2012; Younes *et al.*, 2016), ácido nalidíxico (Rajan *et al.*, 2001; Younes *et al.*, 2016), ácido oxolínico (Zorrilla *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004), gentamicina (Oh *et al.*, 2011; Sonia & Lipton, 2012), flumequina (Rajan *et al.*, 2001; Zorrilla *et al.*, 2003), kanamicina (Younes *et al.*, 2016) y sulfatrimetoprim (Rajan *et al.*, 2001).

Otros estudios señalan sensibilidad moderada frente a kanamicina (Liu *et al.*, 2004).

HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS

Krupesha sharma *et al.* (2013) describieron congestión y hemorragia en el cerebro y tejido branquial, evidenciándose en este órgano hiperplasia de las células epiteliales a nivel del extremo distal de la lamela secundaria, provocando fusión.

En pocos casos se observó hemorragia pericardiaca en el corazón.

En el hígado se apreció congestión y hemorragia, hepatocitos hinchados con vacuolización, los cuales se encontraban dispuestos alrededor de los vasos sanguíneos en plena degeneración y necrosis.

También se reportaron lesiones en riñón posterior como degeneración hialina, necrosis de los túbulos renales y glomérulos, así como presencia de hemorragia, congestión y células inflamatorias.

A nivel de la submucosa intestinal se observó congestión y hemorragia.

b) AGENTE CAUSAL:

La bacteria *V. cholerae* es un bastón Gram negativo, discretamente curvo que pertenece a la familia Vibrionaceae, cuyas dimensiones oscilan entre 0,7 - 1 micra de diámetro y de 1,5 - 3 µm de longitud, posee un flagelo polar simple que le confiere motilidad (Austin & Austin, 2007).

Según Maheshwari *et al.*, (2011) existen dos serotipos de *V. cholerae*: O1 y non O1. El serotipo O1 incluye dos biotipos llamados el Clásico y El Tor. De acuerdo con el esquema de tipificación de Sakazaki & Shimada existen 139 grupos O. Cabe destacar que *V. cholerae* O1 y O139 son conocidos por ser cepas dominantes y patogénicas.

EPIDEMIOLOGÍA

HOSPEDADORES

Buller, (2014) reportó casos de vibriosis en tilapia (*O. niloticus*). Asimismo se han descrito brotes de esta enfermedad en otras especies de peces, tales como goldfish (*Carassius auratus*) (Austin & Austin, 2007), tetra cardenal (*Paracheirodon axelrodi*), pez gato rafaello (*Platydoras costatus*), condrostoma común (*Chondrostoma nasus*), cacho (*Squalius cephalus*), gobio (*Gobio gobio*),

pez lobo (*Barbatula barbatula*), timalo (*Thymallus thymallus*), alburno bimaclado (*Alburnoides bipunctatus*) y trucha marrón (*Salmo trutta*) (Rehulka *et al.*, 2015).

En algunas especies marinas también se registrado la infección producida por esta enfermedad, entre las cuales se incluyen el ayu (*Plecoglossus altivelis*) (Austin & Austin, 2007) y lisa (*Mugil cephalus*) (Rehulka *et al.*, 2015).

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA PRESENTACIÓN DE LA ENFERMEDAD

OCURRENCIA DE BROTES

Se ha descrito la entidad patológica cuando se producen cambios anormales de los factores ambientales abióticos como el incremento de la temperatura del agua, habiéndose registrado brotes de enfermedad en ayu en época de verano y a principios de otoño cuando la temperatura del agua de los ríos fue de 22 °C o mayor (Rehulka *et al.*, 2015). Asimismo se observó elevada mortalidad de dicha especie a temperaturas de 21 y 26 °C (Kiiyukia *et al.*, 1992).

Rehulka *et al.*, (2015) reportaron intensa mortalidad en anguila cuando aumenta la temperatura del agua.

TRANSMISIÓN

La difusión del patógeno entre los peces no está clara, ya que dicho agente es raramente aislado de ambientes acuáticos (Kiiyukia *et al.*, 1992).

SIGNOS DE LA ENFERMEDAD

No se registran casos de esta enfermedad en tilapia. Sin embargo, se han presentado en otras especies, entre los signos tenemos:

SIGNOS EXTERNOS:

Los peces manifiestan congestión branquial, hemorragias petequiales en la superficie corporal (Austin & Austin, 2007), eritema e hiperemia en la región abdominal, boca y base de las aletas (Rehulka *et al.*, 2015).

SIGNOS INTERNOS:

Se presenta el hígado pálido con áreas hiperémicas (Rehulka *et al.*, 2015) y congestión de órganos (Austin & Austin, 2007).

DIAGNÓSTICO Y DETECCIÓN

La vibriosis provocada por *V. cholerae* revela signos clínicos semejantes a infecciones producidas por otras bacterias, tales como: *E. tarda*, *S. putrefaciens*, *A. caviae*, *C. freundii* y *V. alginolyticus* (Austin & Austin, 2007). Por consiguiente, el diagnóstico de esta entidad patológica no puede basarse exclusivamente en la observación de signos clínicos, sino que complementarse con el aislamiento e identificación de la bacteria.

El cultivo bacteriano se puede efectuar en Agar nutritivo, siendo la temperatura óptima de incubación de 30 a 37 °C durante 24 horas. La bacteria *V. cholerae* también crece en otro medio como el agar TCBS, donde las colonias crecen redondas, de bordes lisos y de color amarillo (Muroga *et al.*, 1979; Kiiyukia *et al.*, 1992).

Respecto a la caracterización bioquímica de este patógeno se emplean técnicas convencionales y nuevos métodos como el Sistema miniaturizado API 20 NE (Zarate *et al.*, 2011).

Bioquímicamente dicho patógeno bacteriano se caracteriza por producir metabolismo fermentativo, ácido a partir de glucosa, sacarosa y manitol. Presenta positividad ante las pruebas de citocromo oxidasa, betagalactosidasa, lisina descarboxilasa, rojo de metilo, Voges prokauer y producción de indol (Kiiyukia *et*

al., 1992; Austin & Austin, 2007; Rehulka *et al.*, 2015), galactosa, maltosa, citrato de Simmons y gelatinasa (Kiiyukia *et al.*, 1992; Austin & Austin, 2007). Empero, resulta negativa a las pruebas de lactosa, arginina dehidrolasa (Kiiyukia *et al.*, 1992; Austin & Austin, 2007; Rehulka *et al.*, 2015), ornitina descarboxilasa, fenilalanina deaminasa (Austin & Austin, 2007; Rehulka *et al.*, 2015), urea (Austin & Austin, 2007), arabinosa, celobiosa, inositol, manosa, sorbitol (Kiiyukia *et al.*, 1992; Austin & Austin, 2007) y producción de hidrógeno sulfurado (Kiiyukia *et al.*, 1992; Austin & Austin, 2007; Rehulka *et al.*, 2015). Por otra parte, se ha registrado reacciones de variabilidad en las pruebas de descarboxilación de ornitina, rojo de metilo y producción de ácido a partir de celobiosa (Kiiyukia *et al.*, 1992).

En cuanto a la tolerancia de la bacteria a cloruro de sodio puede crecer en medios de 0 a 3% de sal (Kiiyukia *et al.*, 1992; Inglis *et al.*, 2001). Sin embargo, Muroga *et al.* (1979) describieron tolerancia de cloruro de 0 a 6%.

La bacteria presenta sensibilidad ante el agente vibriostático (O/129) (Inglis *et al.*, 2001; Rehulka *et al.*, 2015).

La confirmación diagnóstica se realiza a través de métodos serológicos como la prueba de aglutinación en placa (Huq *et al.*, 2012) y mediante el empleo de técnicas moleculares como la PCR (Zhang *et al.*, 2012), Hibridación Fluorescente in situ (FISH) y anticuerpo fluorescente directo e indirecto (Huq *et al.*, 2012).

SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA

Las cepas bacterianas de *V. cholerae* pueden presentar susceptibilidad antimicrobiana frente a ácido nalidíxico y tetraciclina, mientras que algunas cepas muestran resistencia a kanamicina (Kiiyukia *et al.*, 1992) y sulfatrimetoprim (Zhang *et al.*, 2012).

2.6.5 SHEWANELLOSIS

a) AGENTE CAUSAL:

La bacteria *Shewanella putrefaciens* es un bastón Gram negativo perteneciente a la familia Shewanellaceae (Ivanova *et al.*, 2004). Mide aproximadamente 0,5 – 1,0 micras de diámetro y 1,5 – 2,0 micras de longitud (Pazdzior, 2016), posee un flagelo polar simple que le proporciona motilidad (Lu & Levin, 2010; Pekala *et al.*, 2015).

Esta bacteria es considerada halófila y posee la habilidad de adaptarse a ambientes de agua dulce (Pazdzior, 2016).

Gillardi reconoció 3 biovares distintos dentro de *S. putrefaciens*, mientras que el Centro de Control y Prevención de Enfermedades registró 2 biotipos basados en la oxidación de carbohidratos y crecimiento en el medio de cultivo Salmonella – Shigella y agar nutritivo con alta concentración de sal (6%) (Khashe & Handa, 1998).

EPIDEMIOLOGÍA

HOSPEDADORES

Si bien no se ha descrito shewanellosis provocada por la bacteria *S. putrefaciens* en tilapia, se han registrado brotes de enfermedad en otras especies de peces como cíclido esmeralda (*Pelvicachromis taeniatus*) (Pazdzior, 2016), carpa común (*Cyprinus carpio* L), carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*), trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Kozinska & Pekala, 2004), trucha común (*Salmo trutta*) (Pazdzior, 2016), locha japonesa del tiempo (*Misgurnus anguillicaudatus*) (Pekala *et al.*, 2015; Öztürk & Altinok, 2014), goldfish (*Carassius auratus*) (Altun *et al.*, 2014), esturión de Siberia (*Acipenser baerii*), lucioperca (*Sander lucioperca*) (Pazdzior, 2016) y misgurno (*Misgurnus anguillicaudatus*) (Qin *et al.*, 2012); así como en algunas especies marinas, tales como pez conejo (*Siganus rivulatus*) y lubina europea (*Dicentrarchus labrax* L) (Kozinska & Pekala, 2004).

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA PRESENTACIÓN DE LA ENFERMEDAD

OCURRENCIA DE BROTES

Se han reportado brotes de enfermedad en cultivo de carpa común y trucha arco iris principalmente en primavera, elevándose la temperatura del agua de 7 a 10 °C, provocando una mortalidad de 2 - 3% por día durante una semana (Pekala *et al.*, 2015).

El porcentaje de mortalidad en otras especies de peces fue estimado en 40 a 85% (Kozinska & Pekala, 2004; Qin *et al.*, 2012).

SIGNOS DE LA ENFERMEDAD

No se han descrito casos de esta enfermedad en tilapia. Sin embargo, se han presentado en otras especies, en las cuales se observa cambios en el comportamiento como nado lento (Saeed *et al.*, 1990).

SIGNOS EXTERNOS:

En peces enfermos se puede apreciar emaciación, necrosis focal de las branquias, exoftalmia bilateral, coloración oscura y lesiones necróticas en piel, abdomen distendido y prolapso hemorrágico del ano (Saeed *et al.*, 1990; Altun *et al.*, 2014; Pekala *et al.*, 2015; Pazdzior, 2016).

SIGNOS INTERNOS:

Presencia del hígado pálido, alargamiento del bazo, riñón edematoso (Altun *et al.*, 2014; Pekala *et al.*, 2015), hemorragias petequiales en la vejiga natatoria (Pazdzior, 2016), gónada y peritoneo (Kozinska & Pekala, 2004), así como líquido ascítico en la cavidad abdominal (Altun *et al.*, 2014; Pekala *et al.*, 2015).

DIAGNÓSTICO Y DETECCIÓN

La shewanellosis revela signos clínicos similares a infecciones producidas por otras bacterias, tales como: *A. caviae*, *V. alginolyticus* y *V. cholerae* (Austin & Austin, 2007). Por consiguiente, el diagnóstico de esta entidad patológica no puede confirmarse únicamente con la visualización de signos clínicos, siendo necesario efectuar el aislamiento e identificación de *S. putrefaciens*.

El cultivo bacteriano puede efectuarse en el medio TSA a una temperatura de incubación de 15 a 42 °C durante 24 horas (Austin & Austin, 2007), en donde las colonias presentan dimensiones de 1 a 2 mm de diámetro, aspecto liso, brillante, discretamente convexas y coloración naranja o salmón (Pekala *et al.*, 2015; Pazdzior, 2016).

Respecto a la caracterización bioquímica de este patógeno se usan técnicas convencionales y nuevos métodos como los Sistemas API-20E y API-20 NE (El-Barbary, 2017), los cuales incluyen en su base de datos a la bacteria *S. putrefaciens* (Holt *et al.*, 2005).

Bioquímicamente *S. putrefaciens* se caracteriza por constituir un grupo homogéneo, siendo una bacteria que no metaboliza fermentativamente la glucosa y presenta reacción positiva ante las pruebas de citocromo oxidasa y maltosa. No obstante, es negativa a otras pruebas como Voges Proskauer (Kozinska & Pekala, 2004; Pazdzior, 2016), producción de indol y ácido a partir de inositol, manitol, sorbitol, rhamnosa, melobiosa, amigdalina y lactosa. Estas características han sido reportadas por distintos (Kozinska & Pekala, 2004; Qin *et al.*, 2012; Altun *et al.*, 2014; Pekala *et al.*, 2015). Por otra parte, se han descrito reacciones variables en las pruebas de citrato de Simmons (Kozinska & Pekala, 2004; Pekala *et al.*, 2015), producción de hidrógeno sulfurado (Pekala *et al.*, 2015) y ácido a partir de sacarosa (Kozinska & Pekala, 2004; Qin *et al.*, 2012).

La confirmación diagnóstica de la bacteria se efectúa mediante la utilización de técnicas de biología molecular como la PCR (El-Barbary, 2017), PCR en tiempo real y Amplificación Isotérmica de Ácidos Nucleicos (LAMP), siendo

herramientas poderosas para la detección de dicho patógeno (Suebsing *et al.*, 2015).

SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA

Las cepas bacterianas de *S. putrefaciens* pueden exhibir susceptibilidad antimicrobiana a diferentes compuestos como ácido oxolínico, ácido nalidixico, florfenicol, flumequina gentamicina y sulfatrimetoprim (Altun *et al.*, 2014; Pekala *et al.*, 2015; Pazdzior, 2016). Asimismo, pueden ofrecer resistencia a kanamicina y tetraciclina (Altun *et al.*, 2014).

Otras investigaciones consignan sensibilidad intermedia ante oxitetraciclina (Pekala *et al.*, 2015), mientras que algunos autores (Kozinska & Pekala, 2004; Altun *et al.*, 2014) reportan sensibilidad.

HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS

Altun *et al.* (2014) describieron lesiones en tejidos de goldfish, las cuales incluyeron depleción de pulpa roja y blanca del bazo, así como el depósito de hemosiderina en centro de melanomacrófagos. En riñón se observó severa necrosis de los túbulos renales y células mononucleares en tejido conectivo circunscrito a las áreas necróticas.

En estudios realizados por Saeed *et al.* (1990) en pez conejo, hallaron lesiones en branquias como hiperemia lamelar, hiperplasia interlamelar y leve edema con hemorragia en el epitelio respiratorio. Asimismo a nivel del riñón posterior, apreciaron edema y necrosis en los túbulos renales; en el hígado observaron atrofia de los hepatocitos, dilatación de los capilares sinusoides, hemorragia en las paredes vasculares y en algunos casos degeneración hidrópica de las células hepáticas; en tejido esplénico reportaron edema extenso en la pulpa.

b) AGENTE CAUSAL:

La bacteria *Shewanella algae* es un bastón Gram negativo perteneciente a la familia Shewanellaceae (Ivanova *et al.*, 2004). Mide 1,0 μm de diámetro y 2,0 μm de largo (Beleneva *et al.*, 2009), posee un flagelo polar simple que le confiere motilidad (Holt *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2006).

Es una bacteria marina mesofílica considerada la especie más virulenta por su actividad hemolítica (Holt *et al.*, 2005; Vignier *et al.*, 2013).

EPIDEMIOLOGÍA

HOSPEDADORES

La bacteria *S. algae* ha sido reportada en brotes de enfermedad en peces y moluscos marinos como corvina (*Scinops ocellata*) (Chen *et al.*, 2003), post larvas de abalón (*Haliotis diversicolor supertexta*) y mejillón zebra (*Dreissena polymorpha*) (Cai *et al.*, 2006).

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA PRESENTACIÓN DE LA ENFERMEDAD

No se tienen reportes de los factores condicionantes que influyen en la manifestación de esta patología.

OCURRENCIA DE BROTES

La patogenicidad de esta bacteria se mostró en algunos peces y moluscos (Beleneva *et al.*, 2009).

SIGNOS DE LA ENFERMEDAD

No se han descrito casos de esta enfermedad en tilapia. Sin embargo, se han manifestado en otras especies.

SIGNOS EXTERNOS:

Los peces enfermos pueden presentar melanosis, secreción de gran cantidad de mucus, ulceraciones en piel y distensión abdominal (Chen *et al.*, 2003).

SIGNOS INTERNOS:

Presencia de fluido en el intestino, congestión renal, hidronefrosis y ascitis (Chen *et al.*, 2003).

DIAGNÓSTICO Y DETECCIÓN

El cultivo bacteriano se puede efectuar en agar Salmonella - Shigella a una temperatura de incubación de 35 y 42 °C (Khashe & Janda, 1998; Beleneva *et al.*, 2009). Dicho patógeno también crece en agar sangre, donde las colonias presentan aspecto mucoso y producen beta hemólisis (Vignier *et al.*, 2013).

Respecto a la caracterización bioquímica del patógeno se utilizan técnicas convencionales y el Sistema API 20 E (Cai *et al.*, 2006), el cual no incluye en su base de datos el perfil bioquímico de dicha bacteria (Holt *et al.*, 2005).

Bioquímicamente *S. algae* se caracteriza por conformar un grupo homogéneo, siendo una bacteria metabólicamente fermentativa, positiva a las pruebas de citocromo oxidasa, producción de hidrógeno sulfurado y citrato (Khashe & Janda, 1998; Cai *et al.*, 2006; Beleneva *et al.*, 2009). No obstante, resulta negativa a las pruebas de hidrólisis de urea, producción de indol (Holt *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2006) y ácido a partir de lactosa, manitol, arabinosa, glucosa, maltosa, inositol y sacarosa (Khashe & Janda, 1998; Cai *et al.*, 2006; Beleneva *et al.*, 2009).

En cuanto a la tolerancia de la bacteria a cloruro de sodio, puede crecer en medios con 6,5% a 8% de sal (Fonnesbech Vogel *et al.*, 1997; Khashe & Janda, 1998; Beleneva *et al.*, 2009).

La confirmación diagnóstica se efectúa a través de técnicas moleculares como la PCR (Polymerase chain reaction) (Cai *et al.*, 2006).

SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA

Las cepas bacterianas de *S. algae* pueden exhibir susceptibilidad antimicrobiana a diferentes antibióticos como kanamicina, gentamicina (Cai *et al.*, 2006), flumequina y ácido nalidíxico (Holt *et al.*, 2005), así como tolerancia a tetracilina (Fonnesbech Vogel *et al.*, 1997).

2.6.6 SEPTICEMIA HEMORRÁGICA PRODUCIDA POR *Aeromonas*

Esta enfermedad es producida por *Aeromonas* móviles, tales como: *Aeromonas hydrophila*, *A. veronii* y *A. caviae*, entre otras (Shayo *et al.*, 2012).

AGENTE CAUSAL:

La bacteria *Aeromonas caviae* es un bacilo o cocobacilo, Gram negativo que pertenece a la familia Aeromonadaceae, cuyas dimensiones aproximadamente son 0,5 micras de diámetro y 1 – 1,5 µm de longitud y posee un flagelo polar simple que le confiere motilidad (Inglis *et al.*, 2001).

Existen dos sistemas de serotipificación propuestos para *Aeromonas* sp., entre los cuales figuran:

- **Sistema NIH** (Instituto Nacional de Salud, Japón) de Sakazaki & Shimada que reconocen 44 serogrupos O y 52 grupos provisionales descritos por otros investigadores.
- **Sistema NIPHEH** (Instituto Nacional de Salud Pública e Higiene Ambiental, Países Bajos) de Guinee y Jansen, quienes han identificado 30 serogrupos O.

Cabe destacar que mediante el uso de los sistemas anteriormente citados, se han identificado varios serogrupos importantes en medicina y acuicultura. Los

serogrupos O11, O16, O34 y O14 pertenecientes al Sistema NIH corresponden a los serogrupos O3, O6, O11 y O19 (Sistema NIPHEH), respectivamente, los cuales son asociados con septicemia producida por *Aeromonas motiles* en trucha arco iris.

Las cepas de *Aeromonas* pertenecientes a los serogrupos O14 y O81 del Sistema NIH han sido identificadas como patógenos en anguila europea (Kozinska & Pekala, 2010).

EPIDEMIOLOGÍA

HOSPEDADORES

La septicemia hemorrágica ha sido reportada en especies de peces no cíclidos como carpín común (*Carassius carassius*), rohu (*Labeo rohita*), perca (*Perca fluviatilis*), perca amarilla (*Perca flavescens*), lubina blanca (*Roccus americanus*), barramundi (*Lates calcifer*) (Joseph & Carnaham, 1994), salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y trucha arco iris (Austin & Austin, 20017). Además, esta enfermedad ha ocurrido en algunas especies marinas como la lubina (*Dicentrarchus labrax*), bacalao (*Gadus morhua*), pez gobio (*Glossogobius giuris*) (Janda & Abott, 2010), lisa (*Mugil cephalus*) y grouper (*Epinephelus malabaricus*) (Joseph & Carnaham, 1994).

Laterça *et al.* (2008) y Ashiru *et al.* (2011) describieron la tilapia (*O. niloticus*) como portador del patógeno *A. caviae*.

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA PRESENTACIÓN DE LA ENFERMEDAD

OCURRENCIA DE BROTES

En cultivo de carpas y goldfish se presentan brotes de enfermedad en primavera, cuando se incrementa la temperatura y el nivel de nutrientes en el agua, debido a que el metabolismo del pez se eleva. Del mismo modo, se presenta la enfermedad en salmónidos por la repentina elevación de la

temperatura del agua o durante la época de madurez sexual (Inglis *et al.*, 2001), habiéndose reportado elevadas mortalidades cuando se incrementa la temperatura del agua por encima de los 20 °C (Candan *et al.*, 1995).

SIGNOS DE LA ENFERMEDAD

No se han descrito casos de esta enfermedad en tilapia. Sin embargo, se han presentado en otras especies.

SIGNOS EXTERNOS:

En peces enfermos se puede manifestar melanosis, exoftalmia unilateral o bilateral, protuberancias en piel en cuyo interior se encuentra un exudado turbio con sangre, erosiones en la cabeza, aletas, cola y alrededor del ano (Candan *et al.*, 1995; Umunna *et al.*, 2015), hemorragia cutánea, petequias en el abdomen y exceso de mucus en piel y branquias (Ogara *et al.*, 1998; Rehulka, 2002).

SIGNOS INTERNOS:

Presencia de hemorragia en hígado, grasa abdominal, gónadas y músculo esquelético, hepatomegalia, esplenomegalia, enteritis mucocatarral con sangre (Candan *et al.*, 1995) e hiperemia de la pared de la vejiga natatoria (Ogara *et al.*, 1998; Rehulka, 2002).

DIAGNÓSTICO Y DETECCIÓN

La septicemia hemorrágica exhibe signos semejantes a infecciones producidas por otras bacterias, tales como: *E. tarda*, *S. putrefaciens*, *C. freundii*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae* y otras especies de *Aeromonas* (Austin & Austin, 2007). Por tanto, el diagnóstico de esta patología no puede sustentarse únicamente en la observación de signos clínicos, sino que debe ser complementado con el aislamiento e identificación de *A. caviae*.

El cultivo bacteriano puede efectuarse en agar TSA, siendo la temperatura óptima de incubación de 22 °C por 24 horas (Austin & Austin, 2007).

Respecto a la caracterización bioquímica de esta bacteria se emplean técnicas convencionales y los sistemas API 20 NE y API 20 E (Ogden *et al.*, 1993; Bashir *et al.*, 2005).

Bioquímicamente la bacteria *A. caviae* presenta metabolismo fermentativo, reacciona positivamente ante las pruebas de catalasa, citocromo oxidasa, beta galactosidasa, producción de indol (Ogara *et al.*, 1998; Abbott *et al.*, 2003; Austin & Austin, 2012), formación de ácido a partir de arabinosa, glucosa, manitol (Inglis *et al.*, 2001; Abbott *et al.*, 2003; Austin & Austin, 2012), sorbitol (Austin & Austin, 2012) y sacarosa (Abbott *et al.*, 2003; Austin & Austin, 2012). Empero, resulta negativa a las pruebas de úrea, citrato (Ogara *et al.*, 1998; Austin & Austin, 2012), descarboxilación de lisina y ornitina (Abbott *et al.*, 2003; Austin & Austin, 2012), Voges Proskauer (Abbott *et al.*, 2003), inositol, rhamnosa (Abbott *et al.*, 2003; Austin & Austin, 2012) e hidrógeno sulfurado (Austin & Austin, 2012). Por otra parte, se han descrito reacciones variables en las pruebas de úrea (Abbott *et al.*, 2003), citrato y sorbitol (Inglis *et al.*, 2001; Abbott *et al.*, 2003).

La confirmación diagnóstica se realiza mediante el uso de técnicas serológicas como la prueba de aglutinación en placa. Asimismo, se utilizan las siguientes técnicas moleculares: Polimorfismo de Longitud de Fragmento de Restricción (RFLP) (Kozinska & Pekala, 2010), Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos amplificados (AFLP) (Demarta *et al.*, 1999) y Reacción en Cadena de la Polimerasa (Hays *et al.*, 2016).

SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA

Las cepas de *A. caviae* pueden evidenciar sensibilidad a sulfatrimetoprim, tetraciclina, estreptomina (Ogara *et al.*, 1998) y gentamicina (Ogara *et al.*, 1998; Ashiru *et al.*, 2011). Asimismo, pueden ofrecer resistencia a ampicilina (Ogara *et al.*, 1998), ácido nalidíxico, ciprofloxacino (Hatha *et al.*, 2005) y oxitetraciclina (Hatha *et al.*, 2005; Ashiru *et al.*, 2011).

HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS

Ogara *et al.*, (1998) describieron en trucha la presencia de hiperemia y degeneración celular a nivel de hígado, riñón, bazo y músculo esquelético.

Estudios realizados en trucha por Rehulka (2002) registraron congestión y edema a nivel de la vejiga natatoria.

2.7 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR BACTERIANA (Rodicio & Mendoza, 2004)

El ARN ribosomal (ARNr) 16S se le conoce con el nombre de ADN ribosomal 16S (ADNr 16S), es una macromolécula constituida aproximadamente por 1500 nucleótidos y es ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía.

Existen distintos grupos filogenéticos que poseen la región 16S ARNr y evidencian la presencia de oligonucleótidos firma, los cuales poseen una o más secuencias específicas pequeñas que se encuentran presentes en la totalidad de los integrantes de un grupo filogenético establecido y no se localizan en otros grupos. Por lo tanto los oligonucleótidos firma se pueden emplear para ubicar a cada bacteria en su propio grupo.

Se ha observado un determinado grado de heterogeneidad entre las réplicas codificadas de la región 16S ARNr, por un mismo conjunto de genes contenidos en los cromosomas.

Características relevantes del gen 16S ARNr para su utilización como herramienta filogenética y taxonómica

Aunque existen cronómetros moleculares alternativos al 16S ARNr, actualmente ninguno ha logrado desplazarlo, ya que esta macromolécula posee varias características y ha sido considerada como un cronómetro molecular definitivo:

1. Es una molécula primitiva que se encuentra presente en la totalidad de bacterias y se caracteriza por constituir un elemento universal para la identificación bacteriana.
2. Su conformación y función se han mantenido estables durante un periodo continuo, por lo tanto, las variaciones en la secuencia evidencian posiblemente modificaciones aleatorias.
3. La dimensión relativamente larga de la región 16S ARNr disminuye estadísticamente las variaciones.
4. La preservación de la conformación secundaria podría utilizarse en las equiparaciones, proporcionando soporte para realizar un alineamiento adecuado.
5. Dado que es sencillo secuenciar la región 16S ARNr, cabe destacar que se cuenta con gran cantidad de información que se encuentra en constante desarrollo.

Inmediatamente después de establecer la secuencia nucleotídica y realizar equiparaciones entre las secuencias de la región 16S ARNr de un par de bacterias, se obtiene un nivel de semejanza, demostrándose su relación de desarrollo. Asimismo, la observación comparativa de las secuencias posibilita la construcción de árboles filogenéticos, que muestran mediante gráficas la genealogía molecular bacteriana y su nivel evolutivo en el entorno de los organismos contrastados. Sin embargo, se debe tomar en consideración que para obtener una asociación evolutiva se deben equiparar la totalidad de los genomas, y no confrontar los 16S ARNr.

En estudios de revinculación ADN-ADN de una especie bacteriana, cabe destacar que desde el punto de vista taxonómico dicha especie constituye un grupo de cepas que guardan semejanza de 70% a más. Por otra parte, valores menores a 97%, es poco probable que esten vinculados en la categoría de especie. No obstante, existen cepas que coinciden con una similaridad menor a

50% en experimentos de reasociación, siendo clasificadas como especies distintas, pero pueden mostrar una similitud de 99 a 100% en la región 16S ARNr.

2.8 MEDIDAS DE MANEJO

La finalidad de adoptar medidas de manejo en un centro de cultivo es proporcionar puntos de control efectivos para gestionar el riesgo de transmisión de enfermedades dentro y fuera de la granja (SCAAH, 2017).

Principales rutas de transmisión de enfermedades

Los patógenos y las enfermedades pueden entrar o salir de la piscigranja por muchas rutas, las cuales deben ser consideradas para manejar el riesgo de entrada de patógenos, diseminación y salida de enfermedades en la granja.

Las principales rutas de transmisión incluyen: animales, agua, equipo, alimento, personas y desperdicios.

Rutas de transmisión en la granja:

a) Animales:

Cuando los animales acuáticos entran a la granja pueden constituir un riesgo significativo de traer enfermedades, particularmente si se desconoce el estado de salud de los mismos, debiendo ser aislados en unidades de producción separadas (Ministry for Primary Industries, 2016; SCAAH, 2017). Entre los animales acuáticos que pueden actuar como vectores de enfermedad se pueden incluir a los reproductores y stock de semillas (SCAAH, 2017).

Los animales silvestres pueden representar un riesgo de transmisión de enfermedades en la granja como las aves y roedores, debido a que actúan como depredadores, debiéndose excluir o controlar dichos organismos (Ministry for Primary Industries, 2016; SCAAH, 2017).

Se debe mantener una densidad poblacional apropiada (Ministry for Primary Industries, 2016).

b) Desechos:

Productos de desechos como: animales muertos, procesamiento de agua, desperdicios y limpieza de efluentes pueden ser vectores de transmisión de enfermedades en la granja, requiriéndose infraestructura y procedimientos apropiados para el manejo de riesgos de enfermedades asociadas con los productos de desecho (SCAAH, 2017).

c) Equipos y vehículos:

Los equipos que están en contacto con animales acuáticos pueden ser un riesgo en la transmisión de enfermedades, tales como: redes, clasificadores y equipos de alimentación (SCAAH, 2017), por lo cual se deberá evitar compartir dichos implementos entre las distintas áreas y efectuar la limpieza y desinfección de los mismos (Ministry for Primary Industries, 2016).

Vehículos de transporte como: autos, camiones o tractores pueden introducir patógenos a la granja, para lo cual se deberá prevenir su entrada a través del uso de rodaluvio (SCAAH, 2017).

d) Agua:

El suministro de agua en la granja es muy importante, ya que tiene influencia en la salud animal. En las instalaciones de tierra, los riesgos de transmisión de enfermedades dependen de la naturaleza del recurso hídrico, presencia de animales hospederos en el agua y la proximidad de otras granjas que pueden descargar sus efluentes a la fuente de agua (SCAAH, 2017), debiendo tratar la misma a un nivel aceptable con la finalidad de minimizar el riesgo de entrada de pestes y enfermedades a las instalaciones de la piscigranja (Ministry for Primary Industries, 2016).

e) Alimento:

Alimento manufacturado como pellets extruidos generalmente representa un bajo riesgo para la transmisión de enfermedades debido a la inactivación de patógenos en el proceso de fabricación. Sin embargo, el alimento vivo, fresco o congelado puede representar un riesgo significativo (SCAAH, 2017).

El alimento se almacenará en áreas diseñadas para evitar la contaminación y reducir la calidad del mismo (Ministry for Primary Industries, 2016).

f) Personas:

Los individuos que trabajan o visitan la piscigranja pueden representar un riesgo significativo en la introducción de enfermedades, particularmente cuando ellos visitan otros centros de cultivo o ambientes que presentan enfermedades. Las personas pueden introducir patógenos a través de la piel, ropa y calzado (SCAAH, 2017), pudiendo impedir la introducción de los mismos mediante la adopción de medidas preventivas como el uso de pediluvio y maniluvio en las instalaciones de la piscigranja (Ministry for Primary Industries, 2016).

Rutas de transmisión dentro de la granja:

Las rutas son manejadas por medidas de bioseguridad internas, siendo similares a las adoptadas en la granja. Sin embargo, los riesgos de transmisión de enfermedades se dan por la diseminación de la misma entre las distintas áreas de producción. En muchos casos las distintas poblaciones de la granja tendrán diferentes niveles de salud. Por ejemplo: El área de reproductores y eclojería debe tener un elevado nivel de salud, área de nursery un nivel medianamente bajo y engorde deberán tener el estatus de salud más bajo en la granja. Se deberá tener en consideración el riesgo de transmisión de enfermedades entre estas áreas (SCAAH, 2017).

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las patologías en cultivo de tilapia son ocasionadas por una gran diversidad bacteriana en los distintos estadios biológicos de producción.

OBJETIVOS:

3.1 General: Caracterizar molecularmente las bacterias patógenas causantes de enfermedades en cultivo intensivo de tilapia *Oreochromis niloticus* en una piscigranja en el departamento de Lima.

3.2 Específicos:

- Aislar y caracterizar fenotípicamente a los patógenos bacterianos causantes de enfermedades en cultivo de tilapia.
- Identificar las cepas bacterianas patógenas mediante la técnica molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).
- Evaluar el comportamiento de las cepas bacterianas ante los antimicrobianos empleados en la actividad acuícola mediante pruebas de sensibilidad antibiótica.
- Examinar los daños tisulares ocasionados por los patógenos bacterianos en ejemplares afectados usando técnicas de histología.
- Determinar la frecuencia de peces con síntomas de enfermedad por patógenos bacterianos en la piscigranja estudiada.
- Determinar el manejo sanitario en la piscigranja estudiada.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 LUGAR DE MUESTREO

La piscigranja de sistema intensivo se encuentra localizada en la provincia de Huaura en el departamento de Lima (11.08 °S, 77.60 °W) (Figura 1), cuya agua es abastecida por un ojo de agua salobre (1 ppt. de salinidad).



Figura 1. Localización de la piscigranja en la provincia de Huaura.

Los estanques de cultivo de tilapia son de tierra revestidos con geomembrana y se encuentran en el interior de un invernadero (Figura 2).



Figura 2. Estanques de cultivo de tilapia revestidos con geomembrana.

La densidad de siembra en las fases de producción de alevinaje fue 1.6 Kg/m³, crecimiento de 3 Kg/m³ y comercial de 6 Kg/m³. Anualmente producen un promedio de 300 toneladas métricas y el tiempo total de producción es de 7 meses.

4.2 MUESTREO DE CAMPO

Se colectaron 85 tilapias, *O. niloticus*, variedad chitalada, procedentes de cultivo intensivo bajo el sistema biofloc durante los meses de noviembre del año 2013, marzo, junio, setiembre del 2014, enero y octubre del 2015.

Para la colecta de peces, se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia (Corral *et al.*, 2015), obteniéndose la cantidad de muestras según la metodología descrita por Amos (1985) y De Blas *et al.*, (2006). Las tilapias escogidas presentaron aparentes signos de enfermedad, tales como: exoftalmia, melanosis, erosión de las aletas y dificultad para la natación.

Los datos de los parámetros físico – químicos del agua fueron proporcionados por la empresa, utilizando los siguientes implementos:

- Temperatura mediante el uso de termómetro de mercurio (precisión de 0,1 °C).
- Amonio y nitrito con kits colorimétricos (Marca Merck).
- pH con potenciómetro (Marca Hanna).
- Oxígeno disuelto con oxímetro (Marca Handy Polaris - Oxiguard).

4.3 MUESTRAS BIOLÓGICAS

Los ejemplares analizados provenían de sus estanques en funcionamiento y correspondieron a las siguientes fases de producción: alevinaje, crecimiento y comercial, cuyo rango de tallas y pesos se observan en la Tabla 1.

Tabla 1. Tamaño de las muestras de tilapia *O. niloticus* de acuerdo a la fase de producción.

Fase de producción	Rango de tallas (cm)	Pesos (g.)	Número de ejemplares
Alevinaje	1 - 2,5	<2 – 5	18
Crecimiento	11 – 15	5 – 80	25
Comercial	16 - 32,5	80 - 500	42
TOTAL			85

4.4 PROCESAMIENTO EN EL LABORATORIO

Los peces capturados fueron transportados vivos en bolsas de plástico que contenían la cuarta parte llena de agua y el resto insufladas con oxígeno puro, para lo cual se utilizó la metodología descrita en la colección FAO capacitación. Posteriormente dichos peces llegaron al Laboratorio de Virología Clínica Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para la toma de muestras y el procesamiento de órganos tanto para el análisis bacteriológico e histopatológico.

4.5 MANEJO DE LAS MUESTRAS

Las tilapias fueron eutanasiadas mediante la sección de la medula espinal (Bluebook, 2011). Posteriormente se examinó ectoscópicamente las branquias y piel de cada uno de los especímenes, registrándose los hallazgos clínicos en una ficha de historia clínica (anexo).

4.5.1 PROCESAMIENTO BACTERIANO

AISLAMIENTO

La cavidad visceral fue diseccionada asépticamente, para luego inspeccionar macroscópicamente los órganos internos. Posteriormente, se procedió a la homogenización de un “pool de órganos” (bazo y riñón anterior) en solución salina estéril (0,85% Na Cl), el cual fue cultivado en placas con medio TSA y luego fueron incubadas a 35° C durante 24 a 48 horas (Woodland, 2006) (ver anexo).

Subsecuentemente al crecimiento de colonias bacterianas, se procedió al aislamiento y cultivo de las mismas en cepario con agar TSA a una temperatura de incubación de 35° C durante 24 horas.

IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA BACTERIANA

Se realizaron pruebas bacteriológicas de tipificación primaria como coloración Gram, citocromo oxidasa y motilidad en gota pendiente (Woodland, 2006).

IDENTIFICACIÓN BACTERIANA MEDIANTE PRUEBAS BIOQUÍMICAS CONVENCIONALES

Las cepas bacterianas fueron caracterizadas bioquímicamente, efectuando 12 exámenes, tales como: fermentación y oxidación de glucosa, Voges Prokauer, citrato, rojo de metilo, indol y producción de hidrógeno sulfurado en el medio SIM, producción de ácido a partir de glucosa, lactosa, manitol, inositol y sorbitol.

Las pruebas descritas fueron interpretadas a las 24 horas después de su cultivo.

TIPIFICACIÓN BACTERIANA CON EL SISTEMA API 20 NE Y 20 E

Las bacterias fueron caracterizadas bioquímicamente mediante el uso del sistema comercial miniaturizado API 20 NE para no enterobacterias y API 20E para enterobacterias, llevando a cabo el procedimiento según las recomendaciones del fabricante.

4.5.2 SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA

El procesamiento de las cepas se realizó mediante la técnica de difusión en agar, empleando el método de Kirby-Bauer (NCCLS, 2005) (ver anexo), a fin de evaluar la respuesta ante los antimicrobianos, para lo cual se efectuó el siguiente procedimiento:

- Se preparó la suspensión bacteriana en suero fisiológico estéril (NaCl 0,85%) y se realizó la siembra con torunda de algodón estéril sobre una placa de agar Müeller Hinton, distribuyendo homogéneamente el inóculo en 2 a 3 direcciones.
- Se colocaron discos de antibióticos (concentración conocida) sobre las placas sembradas y posteriormente se incubaron durante 24 horas a 30°C. El procedimiento mencionado se realizó por duplicado.
- Se llevó a cabo tres mediciones de los halos de inhibición de cada antimicrobiano evaluado.
- El resultado final obtenido correspondió al promedio de las tres mediciones, el cual fue contrastado con el halo de inhibición estándar reportado en la National Comitee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2005).

4.5.3 IDENTIFICACIÓN BACTERIANA MEDIANTE SECUENCIACIÓN DEL GEN 16S ARNr

Las cepas aisladas e identificadas bioquímicamente como *Edwardsiella tarda*, *Plesiomonas shigelloides*, *Shewanella algae*, *Shewanella putrefaciens*, *Aeromonas caviae*, *Citrobacter freundii*, *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio cholerae* fueron enviadas a la empresa Biodes Laboratorios Soluciones Integrales S.R.L localizada en Tumbes, con la cual trabajamos en colaboración para la extracción de ADN y PCR del gen 16S ARNr (ver anexo).

Se realizaron cultivos de las cepas bacterianas en caldo tripticasa soya (TSB) y se incubaron por 12 horas a 30°C. Posteriormente se recuperaron células bacterianas (25 - 50 mg aproximadamente) procediéndose a realizar la extracción de ADN mediante el método estándar CTAB-DTAB (Gustincich *et al.*, 1991), el cual fue adaptado para células bacterianas por Dulanto *et al.* (2013).

Se adicionó 600 µL de solución DTAB (dodeciltrimetilamonio bromuro 8%, Tris HCl 100 mM pH 8,8, NaCl 1,5 M y EDTA 50 mM) a las células bacterianas contenidas en el microtubo, para luego ser homogenizado con micropistilos plásticos e incubado a 75°C por 10 min. Posteriormente se agitó en vortex durante 20 segundos y se añadió 700 µL de cloroformo HPLC para nuevamente ser agitado en vortex por 20 segundos. Seguidamente, se centrifugó a 13000 rpm por 5 min y se traspasó 250 µL del sobrenadante a otro microtubo, el cual contuvo previamente 100 µL de solución CTAB (5% cetiltrimetilamonio bromuro, 0,4 M NaCl) y 900 µL de agua destilada estéril. Dicho microtubo se puso a incubar a 75°C durante 5 min y se centrifugó a 13000 rpm por 10 min. Inmediatamente el sobrenadante fue decantado y se resuspendió el ADN con 150 µL de solución disolvente (NaCl 1,2 M) para incubarse a 75°C durante 5 min. Posteriormente se realizó la centrifugación a 13000 rpm por 5 min y se traspasó 150 µL de la solución a otro microtubo que contenía 300 µL de etanol absoluto. Dicho microtubo se agitó en vortex durante 20 segundos, para luego centrifugarse a 13000 rpm por 5 min. Subsigientemente, se descartó el sobrenadante evitando perder el pellet de ADN y se colocó prontamente el microtubo boca abajo sobre papel desechable a fin de que escurra toda la solución. A continuación, se esperó

que el microtubo no contenga más de dicha solución, solamente el pellet a fin de agregarle agua de inyección para luego agitarlo en el vortex e incubarlo a 75°C por 5 minutos. Una vez culminada la extracción se almacenó a una temperatura de – 20°C.

PCR del gen 16S ARNr

Se utilizaron los iniciadores universales 8F (5´ AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3´) y 1510R (5´ GGC TAC CTT GTT ACG A 3´) reportados por Weisburg (1991) y Monsalud *et al.* (2003) para estudios filogenéticos bacterianos con la finalidad de realizar la amplificación de la región 16S ARNr comprendida por 1500 pares de bases aproximadamente. La PCR fue realizada en 20 µL del volumen final de reacción en microtubos de 0,2 ml. Posteriormente se preparó una mezcla usando 1,5 mM de MgCl₂, 2 µL de buffer Taq 10X, 0,2 mM de cada dNTPs (100 mM), 10 pmol de cada cebador, 2 µL de ADN bacteriano extraído y 1 U de Taq ADN polimerasa.

Las amplificaciones se efectuaron en termociclador con una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización (94 °C por 1 min), hibridación (55 °C por 1 min) y elongación (72 °C por 2 min), seguido por una extensión final de 5 min a 72 °C.

Electroforesis

Se preparó 50 mL de gel de agarosa al 1 % con buffer de migración TAE 1X. Posteriormente dicha mezcla fue incorporada sobre un molde, al cual se le adicionó un molde con apariencia de peine para elaborar pocillos. Una vez que el gel solidificó fue dispuesto en la cámara de electroforesis y se le adicionó el buffer de migración TAE 1X, cubriéndolo por completo. Posteriormente, en cada pocillo se agregó 5 µL del producto de amplificación y en paralelo se adicionó a un pocillo un marcador de peso molecular de 100 a 1500 pares de bases (pb). Seguidamente, se pusieron los electrodos a una fuente de poder, programándose el suministro de corriente eléctrica durante 20 minutos a 120 V, lo cual permitió la migración del producto de amplificación y del marcador molecular, posteriormente

el gel de agarosa se introdujo en solución de bromuro (1µg/mL) por 5 min. Finalmente se visualizó los geles empleando un transiluminador UV, los cuales fueron fotografiados con cámara digital.

Secuenciamiento de la región 16S ARNr

Para el secuenciamiento se usó 10 microlitros de los productos conseguidos por amplificación en la PCR, los cuales fueron dispuestos en microtubos de 0,2 mL. Además, se preparó en otros microtubos de 0,2 mL porciones de 5 uL de cada cebador universal para el gen 16S ARNr. Dicho material fue empacado y enviado a la empresa Macrogen de Korea para realizar la secuenciación de las 2 cadenas (forward y reverse) de cada producto amplificado.

Análisis bioinformático

Las secuencias forward y reverse obtenidas de cada producto de la PCR fueron procesadas mediante el programa SeqMan II versión 5.03 (DNASTAR) con la finalidad de visualizar los cromatogramas y generar las secuencias consenso. Una vez obtenidas dichas secuencias se utilizó la herramienta Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para verificar la identidad de las cepas bacterianas en estudio.

Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa Clustal X2 (Larkin *et al.*, 2007) para posteriormente construir el árbol filogenético con el programa MEGA V6 (Tamura *et al.*, 2013) usando el método Neighbour-Joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987) y el modelo de distancia Kimura2-parámetros (K2P), considerando 1000 réplicas.

4.5.4 PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO

Se obtuvieron muestras de órganos externos e internos, de los cuales se extrajo fragmentos con dimensiones de 4 mm de espesor y 1 cm de superficie. Posteriormente fueron fijados en solución tamponada de formaldehído al 10% y procesados usando la metodología de Luna (1968) (ver anexo).

En parafina líquida se embebieron las muestras de tejido a fin de conformar los tacos de parafina (ver anexo). Al solidificar estos, se procedió a realizar cortes de tejido de 5 μm de espesor mediante el uso de micrótopo y fueron teñidos con Hematoxilina y Eosina de Harris (ver anexo), para posteriormente observarlos al microscopio y detectar las lesiones en el tejido (microscopio Nikon, modelo Eclipse 90i).

4.6 MEDIDAS DE MANIPULACIÓN SANITARIA DEL CENTRO DE CULTIVO

Al momento de colectar los peces se realizó la visualización de la disposición final del efluente de agua, asepsia de la red para la manipulación de los peces, retiro de ejemplares occisos o agonizantes y aseo de estanques (Ministry for Primary Industries, 2016; SCAAH, 2017).

4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se empleó el programa estadístico SPSS 20, para las pruebas se usó un nivel de confianza del 95%, por lo cual el nivel de significación es de 0.05.

Cada una de las variables de peso del pez, estadio de producción y temperatura del agua fueron evaluadas por separado a fin de realizar el estudio descriptivo y posteriormente se analizó la asociación entre dichas variables cuantitativas a través de la Prueba de Chi-cuadrado de Pearson de independencia estadística, con la cual se validó si las mismas se encontraban asociadas o no con la presencia de peces sintomáticos.

Para evaluar la distribución normal de las variables de peso del pez y temperatura del agua se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov y cuando la distribución no fue normal se aplicó la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney para comparación de medias en ambos grupos de peces (aparentemente sanos y enfermos).

4.8 FRECUENCIA DE PECES CON SÍNTOMAS DE ENFERMEDAD

Schacker *et al.* (1998) definieron la frecuencia de peces con síntomas de enfermedad como la posibilidad que un ejemplar con síntomas de enfermedad presente infección por algún patógeno bacteriano.

La estimación de la frecuencia de peces con síntomas de enfermedad se realizó con la ecuación:

$$\frac{\text{Número de peces infectados}}{\text{Número de peces sintomáticos}} \times 100$$

Hipótesis:

$H_0: \tau_i = 0$ La posibilidad que un pez con signos de enfermedad esté infestado por patógenos bacterianos es independiente de las diferentes variables evaluadas.

$H_1: \tau_i \neq 0$ La posibilidad que un pez con signos de enfermedad esté infestado por patógenos bacterianos es dependiente de alguna de las variables evaluadas.

Las variables analizadas fueron:

- Peso del pez.
- Estadio de producción del pez.
- Temperatura del agua.

V. RESULTADOS

5.1 FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE EN PECES SINTOMÁTICOS

5.1.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA BACTERIA *Edwardsiella tarda*

De las muestras de órganos internos se aislaron 7 cepas bacterianas presuntivas de *Edwardsiella tarda*. Dichas cepas en el medio TSA exhibieron colonias de 1 - 3 mm de diámetro, color blanco cremoso, brillosas, bordes regulares y convexas (Figura 3). Asimismo, en el agar diferencial eosina azul de metileno (EMB) para enterobacterias se observaron colonias de color ámbar, brillosas, bordes regulares y convexas (Figura 4).



Figura 3. Cultivo de *E. tarda* en Agar TSA evidenciando colonias de color blanco cremoso (flechas).



Figura 4. Cultivo de *E. tarda* en agar eosina azul de metileno mostrando colonias de color ámbar (flechas).

Las bacterias aisladas fueron observadas microscópicamente, apreciándose bastones pequeños de 2,44 - 2,57 micras de largo, Gram negativas, motiles, citocromo oxidasa negativa y presentaron metabolismo fermentativo (Figura 5). Dichas características son propias de la familia Enterobacteriaceae y dentro de la misma se encuentra presuntivamente el género *Edwardsiella*.

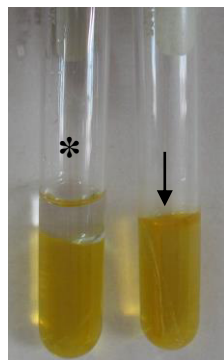


Figura 5. Bacteria *Edwardsiella tarda* fermentando (asterisco) y oxidando la glucosa (flecha).

CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS CON MÉTODOS CONVENCIONALES

Las cepas analizadas fueron positivas a las siguientes pruebas: rojo de metilo, producción de hidrógeno sulfurado, indol y ácido a partir de manitol. Asimismo, todas las cepas resultaron negativas a las pruebas de citrato, Voges proskauer, lactosa y sorbitol (Tabla 2). Asimismo, presentaron variabilidad ante la prueba de inositol.

Tabla 2. Características bioquímicas de *E. tarda* aisladas de tilapia *Oreochromis niloticus*.

Pruebas bioquímicas	Cepas					
	1	2	3	4	5	6
Citocromo oxidasa	-	-	-	-	-	-
OF	F	F	F	F	F	F
Motilidad	+	+	+	+	+	+
Producción de indol	+	+	+	+	+	+
Producción de H ₂ S	+	+	+	+	+	+
Rojo de metilo	+	+	+	+	+	+
Voges Prokauer	-	-	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	-	-	-
TSI	K/A	K/A	K/A	K/A	K/A	K/A
Producción de ácido:						
Glucosa	+	+	+	+	+	+
Lactosa	-	-	-	-	-	-
Manitol	+	+	+	+	+	+
Inositol	+	+	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-

O: oxidación, F: fermentación, H₂S: Hidrógeno sulfurado, TSI: Agar hierro tres azúcares, K: alcalino, A: ácido.

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA CON API 20 E

Mediante este sistema dos cepas fueron identificadas adecuadamente como *Edwardsiella tarda*, obteniéndose el perfil numérico 4544322 con muy buen nivel

de identificación (99,1%) y otros cuatro aislados con perfil 4544102 (compatibles para *E. hoshinae* al 34,6%) y baja discriminación (Tabla 3) (Figura 6).

Tabla 3. Caracterización bioquímica con el Sistema API 20 E de las cepas de *E. tarda* aisladas de tilapia *Oreochromis niloticus*.

Pruebas	Abreviatura	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5	Cepa 6
Citocromo oxidasa	OX	-	-	-	-	-	-
Beta galactosidasa	OPNG	-	-	-	-	-	-
Arginina dihidrolasa	ADH	-	-	-	-	-	-
Lisina descarboxilasa	LDC	+	+	+	+	+	+
Ornitina descarboxilasa	ODC	+	+	+	+	+	+
Citrato	CIT	-	-	-	-	-	-
Producción de hidrógeno sulfurado	H2S	+	+	+	+	+	+
Ureasa	URE	-	-	-	-	-	-
Triptófano desaminasa	TDA	-	-	-	-	-	-
Producción de indol	IND	+	+	+	+	+	+
Voges Proskauer	VP	-	-	-	-	-	-
Gelatinasa	GEL	-	-	-	-	-	-
Fermentación / oxidación:							
Glucosa	GLU	+	+	+	+	+	+
Manitol	MAN	+	+	+	+	+	+
Inositol	INO	+	+	-	-	-	-
Sorbitol	SOR	-	-	-	-	-	-
Rhamnosa	RHA	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	SAC	-	-	-	-	-	-
Melobiosa	MEL	-	-	-	-	-	-
Amigdalina	AMY	-	-	-	-	-	-
Arabinosa	ARA	+	+	+	+	+	+
Perfil numérico		4544322	4544322	4544102	4544102	4544102	4544102

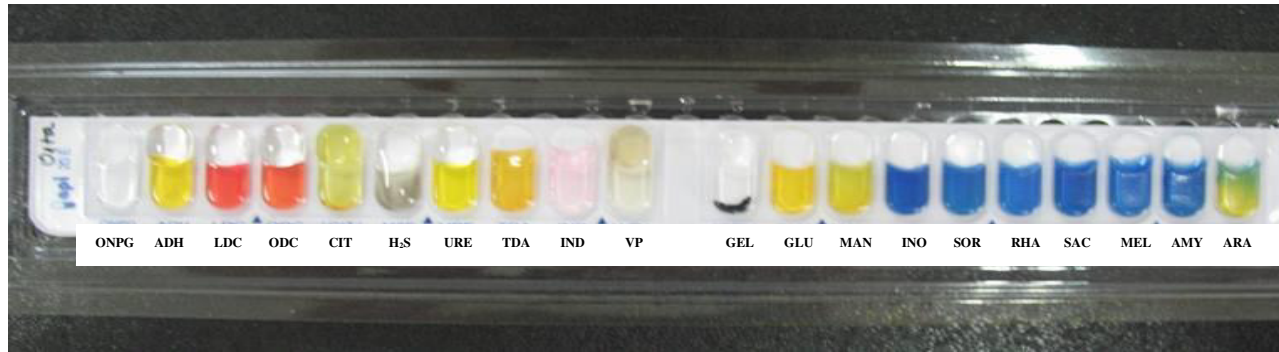


Figura 6. Reacción de la bacteria *E. tarda* en API 20 E.

5.1.2 SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA

Los antibióticos frecuentemente usados en sanidad acuícola mostraron sensibilidad frente a las cepas de *Edwardsiella tarda*, siendo sensibles el 100% a ácido nalidíxico, florfenicol, gentamicina, kanamicina, flumequina, oxitetraciclina y sulfatrimetoprim (Tabla 4) (Figura 7). Los halos de inhibición de los antimicrobianos florfenicol y sulfatrimetoprim exhibieron mayores dimensiones ante las cepas evaluadas (Tabla 5).

Tabla 4. Sensibilidad antibiótica *in vitro* de cepas bacterianas aisladas de tilapia *O. niloticus*.

Bacteria	Número de cepas Evaluadas	FLO		FX		GE		K		OXT		SXT		W	
		(30 µg)		(30 µg)		(10 µg)		(30 µg)		(30 µg)		(25 µg)		(30 µg)	
		N°	(%)	N°	(%)	N°	(%)	N°	(%)	N°	(%)	N°	(%)	N°	(%)
<i>E. tarda</i>	6	6	100,0	6	100,0	6	100,0	6	100,0	6	100,0	6	100,0	6	100,0
<i>C. freundii</i>	2	1	50,0	0	0	2	100,0	2	100,0	0	0	0	0	0	0
<i>P. shiguelloides</i>	5	5	100,0	4	80,0	5	100,0	2	40,0	1	20,0	5	100,0	1	20,0
<i>V. alginolyticus</i>	1	1	100,0	1	100,0	1	100,0	1	100,0	1	100,0	1	100,0	1	100,0
<i>V. cholerae</i>	1	1	100,0	1	100,0	1	100,0	1	100,0	1	100,0	1	100,0	1	100,0
<i>S. putrefaciens</i>	1	1	100,0	1	100,0	1	100,0	1	100,0	0	0	0	0	0	0
<i>S. algae</i>	7	7	100,0	7	100,0	7	100,0	7	100,0	6	86,0	7	100,0	7	100,0
<i>A. caviae</i>	5	5	100,0	5	100,0	5	100,0	5	100,0	3	60,0	5	100,0	1	20,0
Total	28	27	96,0	25	89,0	28	100,0	25	89,0	18	64,0	25	89,0	17	61,0

FLO: Florfenicol, FX: Flumequina, GE: Gentamicina, K: Kanamicina, OXT: Oxitetraciclina, SXT: Sulfatrimetoprim, W: Ácido nalidíxico.

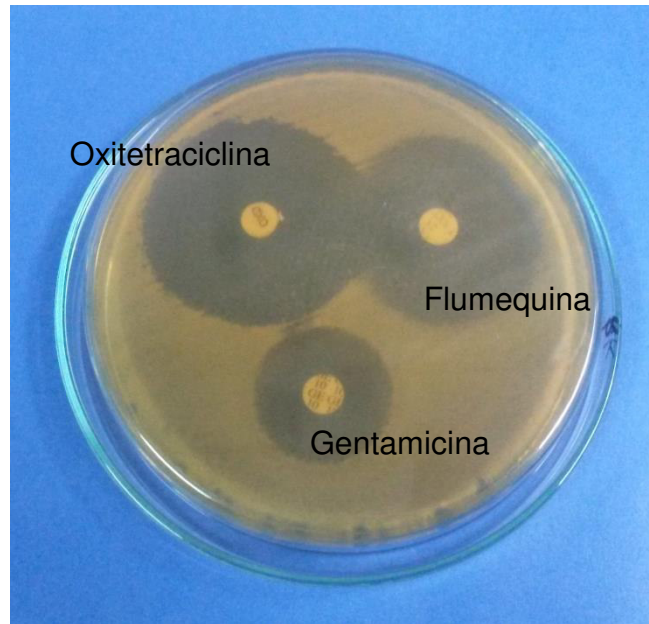


Figura 7. Acción inhibitoria de la bacteria *E. tarda* ante los antimicrobianos frecuentemente utilizados en la actividad acuicola.

Tabla 5. Dimensiones de los halos de inhibición (milímetros) de los discos de susceptibilidad antimicrobiana ante las cepas de *E. tarda*.

Cepas	Florfenicol (30 µg)			Flumequina (30 µg)			Gentamicina (10 µg)			Kanamicina (30 µg)			Oxitetraciclina (30 µg)			Sulfatrimetoprim (25 µg)			Ácido nalidíxico (30 µg)		
	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}
	1	41,0	43,0	42,0	22,0	21,5	21,8	29,0	28,2	28,6	30,0	31,5	30,8	29,0	28,0	28,5	42,0	41,0	41,5	23,0	22,5
2	61,0	62,0	61,5	25,0	24,0	24,5	19,0	20,0	19,5	44,0	42,8	43,4	22,5	21,0	21,8	52,0	50,0	51,0	33,5	33,0	33,3
3	54,0	54,5	54,3	39,0	38,0	38,5	29,0	28,9	29,0	34,5	34,0	34,3	23,0	23,7	23,4	50,0	51,0	50,5	35,0	34,0	34,5
4	47,8	49,0	48,4	43,0	42,8	42,9	31,0	30,0	30,5	35,0	35,3	35,2	25,0	25,6	25,3	37,0	36,5	36,8	43,0	42,8	42,9
5	48,0	49,0	48,5	42,0	42,5	42,3	30,0	29,0	29,5	34,0	34,4	34,2	23,0	23,7	23,4	40,0	39,8	39,9	38,5	38,8	38,7
6	31,0	32,5	31,8	30,0	29,5	29,8	22,0	22,5	22,3	24,0	23,0	23,5	23,5	24,0	23,8	19,0	19,5	19,3	26,5	26,0	26,3
Prom. Total			47,7			33,3			26,6			33,5			24,3			39,8			33,1

A1: Prueba 1; A2: Prueba 2

5.1.3 ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO

SIGNOS PATOLÓGICOS

De las 85 muestras de peces, en 6 de ellas se aisló el patógeno *E. tarda*, se observó con mayor frecuencia la presencia de los siguientes signos externos: exoftalmia bilateral, aletas pectorales eritematosas (Figura 8) y alrededor del ano (3,5%) (Tabla 6). Entre los signos internos se apreciaron nodulaciones blanquecinas en el corazón (1,2%) e hígado (4,7%), así como congestión en intestino y gónadas (2,4%).



Figura 8. Tilapia de la etapa comercial en la cual se aprecia enrojecimiento de las aletas pectorales (flechas).

Tabla 6. Frecuencia de manifestaciones clínicas en tilapia *Oreochromis niloticus* de la cual se aisló *Edwardsiella tarda* (n = 6).

Signos	Número de peces afectados	Frecuencia (%)
Externos		
Exoftalmia bilateral	3	3,5
Eritema debajo de la mandíbula	1	1,2
Eritema en el pecho	1	1,2
Eritema en aletas pectorales	3	3,5
Eritema en el vientre	2	2,4
Enrojecimiento alrededor del ano	3	3,5
Descarga sanguinolenta a través del ano	1	1,2
Internos		
Corazón con nodulaciones blanquecinas	1	1,2
Estómago congestionado	1	1,2
Higado congestionado y con nodulaciones blanquecinas	4	4,7
Higado congestionado	1	1,2
Vesícula biliar oscura e incrementada de tamaño	2	2,4
Intestino congestionado	2	2,4
Gónada congestionada	2	2,4
Ascitis	2	2,4

HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS

En las muestras analizadas se apreció con mayor frecuencia a nivel de las branquias la presencia de necrosis (4,7%) y congestión focal de las lamelas secundarias (3,5%), así como edema focal y fusión de las mismas (1,2%) (Tabla 7).

En tejido cardiaco se observó severa pericarditis con presencia de células granuloesosinofílicas (2,4%) (Figura 9). A nivel auricular se visualizó reacción inflamatoria y edema endotelial (4,7%). En tejido ventricular se halló edema endotelial (2,4%).

En el estómago se encontró edema focal en la lámina propia con células granuloesosinofílicas (4,7%) y necrosis focal del epitelio y de tejido glandular

(2,4%).

En tejido hepático los hallazgos histopatológicos fueron necrosis focal de hepatocitos (2,4%) y reacción inflamatoria perivascular con células granuloeosinofílicas (1,2%).

En el bazo se halló congestión leve (2,4%) y necrosis focal de tipo licuefactiva en parénquima y cápsula (1,2%).

En intestino se observó la lámina propia levemente edematizada con presencia de células granuloeosinofílicas y bacterias (2,4%).

En tejido pancreático se encontró necrosis focal (2,4%).

El efecto patológico sobre el riñón anterior fue necrosis focal de tejido hematopoyético y congestión leve de vasos sanguíneos (2,4%) (Figura 10).

En riñón posterior se observó necrosis focal de túbulos renales (3,5%).

En tejido gonadal se apreció severa necrosis y hemorragia (2,4%).

A nivel de ventrículo cardiaco, tejido hepático (Figura 11), esplénico, renal y gonadal se visualizó necrosis de tipo caseosa formando granulomas.

Tabla 7. Hallazgos histopatológicos en tilapia *O. niloticus* infectada por *Edwardsiella tarda* (n = 6).

Órgano	Lesión	Nº casos	Frecuencia %
Branquias	Aneurismas focales	2	2,4
	Congestión focal	3	3,5
	Necrosis focal	4	4,7
	Lamelas distorsionadas	3	3,5
	Edema focal	1	1,2
	Moderada hiperplasia interlamelar focal	2	2,4
	Fusión de las lamelas	1	1,2
Corazón	Pericardio		
	Severa pericarditis con células granuloeosinofílicas (CGE)	2	2,4
	Aurícula		
	Reacción inflamatoria y edema endotelial	4	4,7
	Ventrículo		
	Edema endotelial focal a nivel del miocardio	2	2,4
	Severo edema endotelial a nivel del miocardio	2	2,4
Presencia de granuloma	1	1,2	
Estómago	Epitelio necrótico con desprendimiento focal	2	2,4
	Neoformación de glándulas gástricas	1	1,2
	Edema de lámina propia con CGE	4	4,7
	Necrosis focal a nivel glandular	2	2,4
Hígado	Degeneración hidrópica de hepatocitos	3	3,5
	Granulomas multifocales	3	3,5
	Congestión focal de vasos sanguíneos	2	2,4
	Reacción inflamatoria focal alrededor de vasos sanguíneos y CGE	1	1,2
	Necrosis focal de hepatocitos	2	2,4
Bazo	Presencia de granuloma	1	1,2
	Congestión focal leve	2	2,4
	Necrosis de tipo licuefactiva focal en parénquima	1	1,2
	Necrosis focal en cápsula	1	1,2
Intestino	Ligero edema focal en lámina propia presencia de CGE y bacterias	2	2,4

(Continua)

Tabla 7. (continuación)

Órgano	Lesión	Nº casos	Frecuencia %
Intestino	Necrosis focal del epitelio de las vellosidades	2	2,4
Ciegos pilóricos	Aparentemente normal	6	7
Páncreas	Necrosis focal	2	2,4
Riñón anterior	Necrosis focal de tejido hematopoyético	2	2,4
	Congestión leve	2	2,4
Riñón posterior	Necrosis focal de túbulos renales	3	3,5
	Edema focal peritubular	1	1,2
	Presencia de granuloma	1	1,2
Gónada	Severa necrosis y hemorragia	2	2,4
	Hemorragia focal	1	1,2
	Presencia de granuloma	1	1,2
Músculo esquelético	Necrosis focal	1	1,2

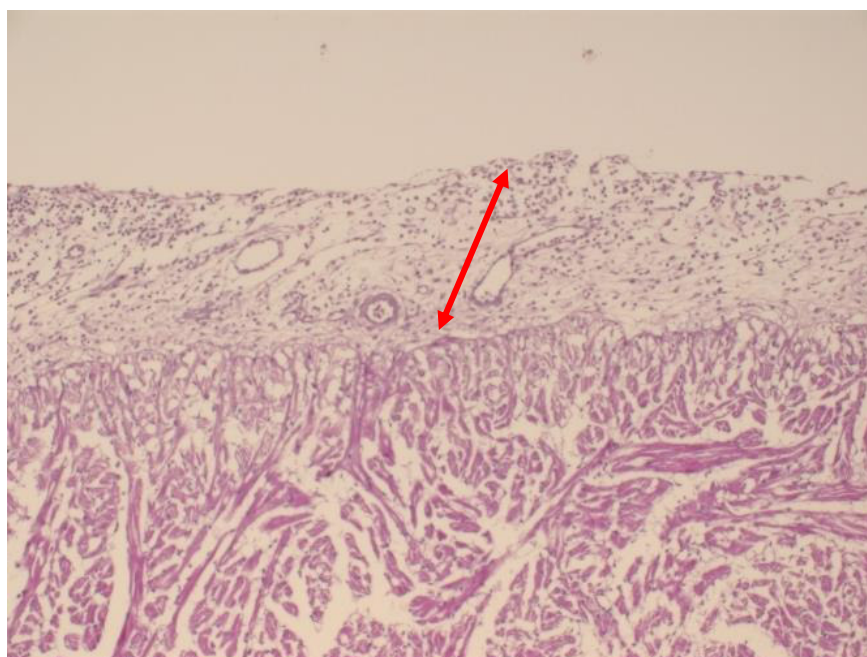


Figura 9. Observación histopatológica de ventrículo cardíaco con marcada pericarditis (flecha). Aumento: 20X.

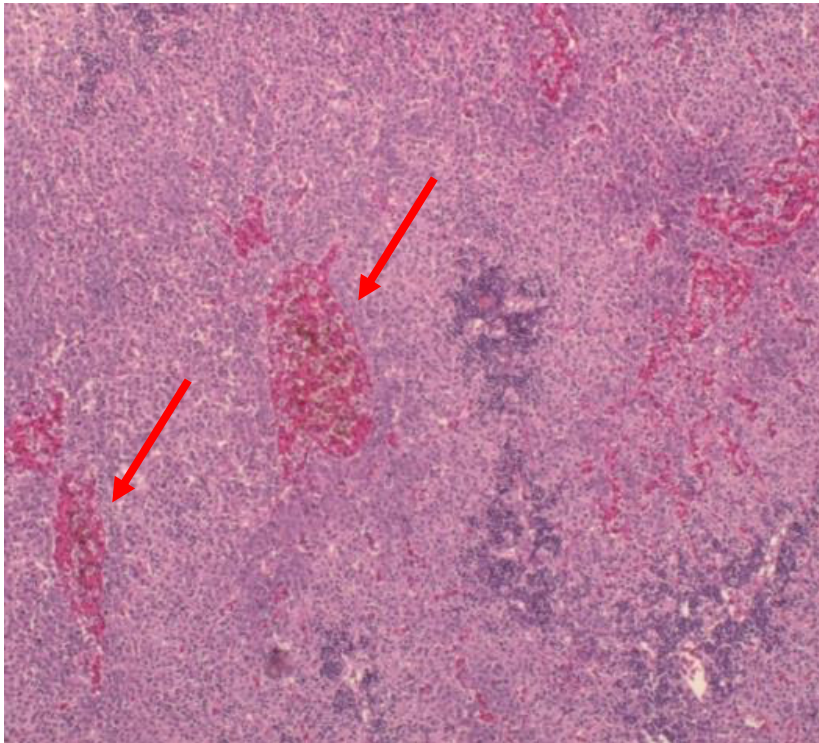


Figura 10. Riñón anterior con congestión focal de vasos sanguíneos (flechas).
Aumento: 20X.

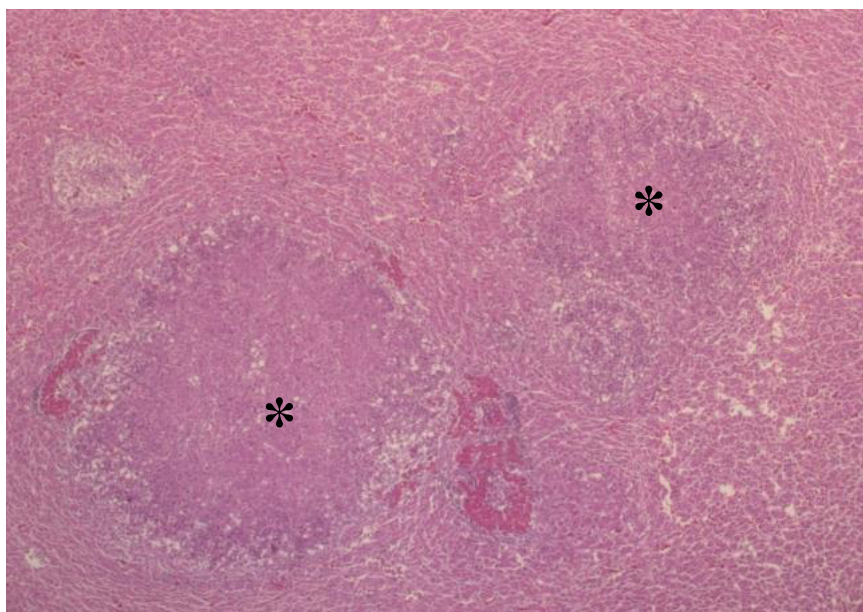


Figura 11. Tejido hepático con granulomas (asteriscos). Aumento: 10X.

5.1.4 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA BACTERIA *Citrobacter freundii*

Se aislaron 2 cepas presuntivas a *C. freundii* cuyas colonias en el medio TSA presentaron 1 a 2,5 mm de diámetro, color blanco cremoso, brillosas de bordes regulares y convexas (Figura 12). Asimismo, dichas cepas crecieron en agar eosina azul de metileno (EMB), apreciándose colonias de color ámbar, brillosas de bordes regulares y convexas (Figura 13).



Figura 12. Cultivo de *C. freundii* en agar TSA exhibiendo colonias de color blanco cremoso (flechas).



Figura 13. Cultivo de *C. freundii* en agar EMB mostrando colonias ámbar (flechas).

Las bacterias aisladas fueron visualizadas microscópicamente apreciándose bastones cortos de 0,7 - 2 micras de largo, Gram negativos, motiles, citocromo oxidasa negativa y metabólicamente fermentadora de glucosa, siendo características inherentes a la familia Enterobacteriaceae y dentro de la misma se encuentra presumiblemente el género *Citrobacter*.

CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS CON MÉTODOS CONVENCIONALES

Las cepas evaluadas revelaron positividad ante las pruebas de rojo de metilo (Figura 14a), citrato y producción de hidrógeno sulfurado y ácido en lactosa, manitol, inositol y sorbitol. Las bacterias fueron corroboradas como negativas a las pruebas de Voges Proskauer (Figura 14b) e indol (Tabla 8).

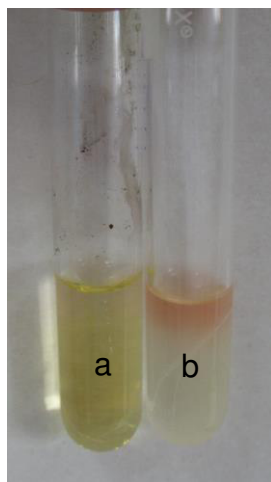


Figura 14. Reacción de la bacteria *C. freundii* mostrando negatividad a la prueba de Voges Proskauer (a) y positividad a rojo de metilo (b).

Tabla 8. Características bioquímicas de la bacteria *Citrobacter freundii* aislada de tilapia *Oreochromis niloticus*.

Pruebas bioquímicas	Cepas	
	7	8
Citocromo oxidasa	-	-
OF	F	F
Motilidad	+	+
Producción de indol	-	-
Producción de H ₂ S	+	+
Rojo de metilo	+	+
Voges Prokaüer	-	-
Citrato	+	+
TSI	A/A	A/A
Producción de ácido:		
Glucosa	+	+
Lactosa	+	+
Manitol	+	+
Inositol	+	+
Sorbitol	+	+

O: oxidación, F: fermentación, H₂S: Hidrógeno sulfurado, TSI: Agar hierro tres azúcares, A: ácido.

CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS CON API 20 E

Mediante la utilización de este sistema, las cepas evaluadas se identificaron correctamente como *Citrobacter freundii*, determinándose el perfil numérico 1604572 con un excelente nivel de identificación (99,9%) (Figura 15) (Tabla 9).

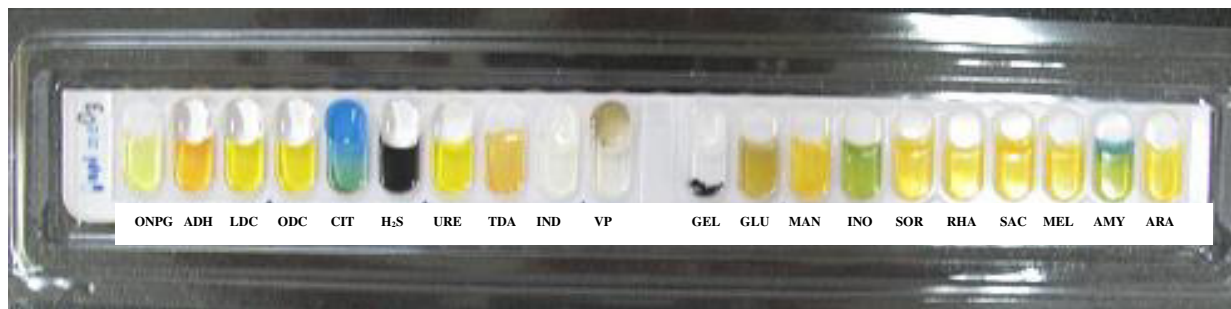


Figura 15. Reacción de la bacteria *C. freundii* en API 20 E.

Tabla 9. Caracterización bioquímica mediante el Sistema API 20 E de la bacteria *Citrobacter freundii* aislada de tilapia *Oreochromis niloticus*.

Pruebas	Abreviatura	Cepa 7	Cepa 8
Oxidasa	OX	-	-
Betagalactosidasa	OPNG	+	+
Arginina dihidrolasa	ADH	-	-
Descarboxilación de lisina	LDC	-	-
Descarboxilación de ornitina	ODC	-	-
Citrato	CIT	+	+
Producción de hidrógeno sulfurado	H ₂ S	+	+
Ureasa	URE	-	-
Desaminación del triptófano	TDA	-	-
Producción de indol	IND	-	-
Voges Proskauer	VP	-	-
Gelatinasa	GEL	-	-
Producción de ácido:			
Glucosa	GLU	+	+
Manitol	MAN	+	+
Inositol	INO	-	-
Sorbitol	SOR	+	+
Rhamnosa	RHA	+	+
Sacarosa	SAC	+	+
Melobiosa	MEL	+	+
Amigdalina	AMY	-	-
Arabinosa	ARA	+	+
Perfil numérico		1604572	1604572

5.1.5 SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA

Los antimicrobianos evaluados como gentamicina y kanamicina evidenciaron acción inhibitoria eficaz contra el 100% de las cepas de *Citrobacter freundii* (Figura 16). Sin embargo, dichos agentes presentaron resistencia frente a flumequina, oxitetraciclina, sulfatrimetoprim y ácido nalidixico (50%) (Tabla 10). Asimismo, se apreció sensibilidad intermedia ante florfenicol, flumequina, oxitetraciclina y ácido nalidixico (50%) (Tabla 11) Los halos de inhibición de los antimicrobianos florfenicol y kanamicina mostraron mayores dimensiones ante las cepas estudiadas (Tabla 12).

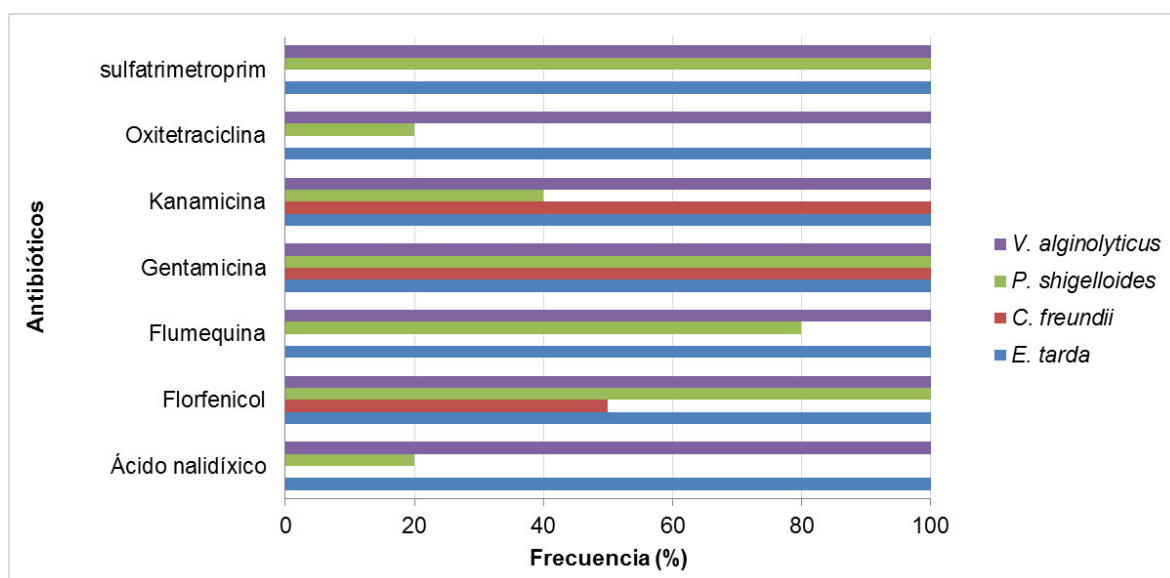


Figura 16. Frecuencia de sensibilidad antibiótica frente a las bacterias patógenas *V. alginolyticus*, *P. shigelloides*, *C. freundii* y *E. tarda* aisladas a partir de tilapias enfermas.

Tabla 10. Resistencia antibiótica *in vitro* de cepas bacterianas aisladas de tilapia *O. niloticus*.

Bacteria	Número de cepas Evaluadas	FLO (30 µg)		FX (30 µg)		GE (10 µg)		K (30 µg)		OXT (30 µg)		SXT (25 µg)		W (30 µg)	
		N°	(%)	N°	(%)	N°	(%)	N°	(%)	N°	(%)	N°	(%)	N°	(%)
		<i>E. tarda</i>	6	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>C. freundii</i>	2	0	0,0	1	50,0	0	0,0	0	0,0	1	50,0	2	100,0	1	50,0
<i>P. shiguelloides</i>	5	0	0,0	1	20,0	0	0,0	0	0,0	4	80,0	0	0,0	3	60,0
<i>V. alginolyticus</i>	1	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>V. cholerae</i>	1	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>S. putrefaciens</i>	1	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	100,0	1	100,0	1	100,0
<i>S. algae</i>	7	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>A. caviae</i>	5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	40,0	0	0,0	3	60,0
Total	28	0	0,0	2	7,1	0	0,0	0	0,0	8	29,0	3	11,0	8	29,0

FLO: Florfenicol, FX: Flumequina, GE: Gentamicina, K: Kanamicina, OXT: Oxitetraciclina, SXT: Sulfatrimetoprim, W: Ácido nalidíxico.

Tabla 11. Sensibilidad antibiótica intermedia *in vitro* de cepas bacterianas aisladas de tilapia *O. niloticus*.

Bacteria	Número de cepas evaluadas	FLO		FX		GE		K		OXT		SXT		W	
		(30 µg)		(30 µg)		(10 µg)		(30 µg)		(30 µg)		(25 µg)		(30 µg)	
		N°	(%)	N°	(%)	N°	(%)	N°	(%)	N°	(%)	N°	(%)	N°	(%)
<i>E. tarda</i>	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. freundii</i>	2	1	50	1	50	0	0	0	0	1	50	0	0	1	50
<i>P. shiguelloides</i>	5	0	0	0	0	0	0	3	60	0	0	0	0	1	20
<i>V. alginolyticus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>V. cholerae</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. putrefaciens</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. algae</i>	7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	14	0	0	0	0
<i>A. caviae</i>	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	20
Total	28	1	3,6	1	3,6	0	0	3	11	2	7	0	0	3	11

FLO: Florfenicol, FX: Flumequina, GE: Gentamicina, K: Kanamicina, OXT: Oxitetraciclina, SXT: Sulfatrimetoprim, W: Ácido nalidíxico.

Tabla 12. Dimensiones de los halos de inhibición (milímetros) de los discos de susceptibilidad antimicrobiana ante las cepas de *C. freundii*.

Cepas	Florfenicol (30 µg)			Flumequina (30 µg)			Gentamicina (10 µg)			Kanamicina (30 µg)			Oxitetraciclina (30 µg)			Sulfatrimetoprim (25 µg)			Ácido nalidíxico (30 µg)		
	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}
7	31,5	30,0	30,8	17,3	17,0	17,1	21,0	20,5	20,8	25,5	26,0	25,8	10,0	9,5	9,8	6,0	5,8	5,9	15,5	16,0	15,8
8	17,5	17,0	17,3	9,0	8,5	8,8	20,0	19,8	19,9	19,0	18,8	18,9	18,5	19,0	18,8	6,0	5,5	5,8	6,0	5,5	5,8
Prom. Total			24,0			12,9			20,3			22,3			14,3			5,7			10,8

A1: Prueba 1; A2: Prueba 2

5.1.6 ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO

SIGNOS PATOLÓGICOS

Externamente se observó eritema en el vientre (1,2%) y ano enrojecido con descarga de fluido sanguinolento (1,2%). Entre los signos internos se visualizó congestión en hígado (2,4%) y gónadas (1,2%) (Tabla 13).

Tabla 13. Frecuencia de manifestaciones clínicas en tilapia *Oreochromis niloticus* de la cual se aisló *Citrobacter freundii* (n = 2).

Signos	Número de peces Afectados	Frecuencia (%)
Externos		
Eritema en vientre	1	1,2
Ano enrojecido con descarga de fluido sanguinolento	1	1,2
Internos		
Hígado con zonas congestivas	2	2,4
Vesícula biliar oscura	1	1,2
Gónadas congestionadas	1	1,2

HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS

Las lesiones histopatológicas detectadas a nivel de tejido branquial fueron ligera congestión de las lamelas primarias y edema focal, cuyas frecuencias de presentación fueron 1,2% y 2,4%, respectivamente (Tabla 14).

En el corazón se observó pericarditis, reacción inflamatoria y edema endotelial focal a nivel de la aurícula y ventrículo (1,2%).

En tejido hepático se encontró degeneración grasa y congestión focal de capilares sinusoides (1,2%).

En el bazo se visualizó congestión severa (1,2%).

Los daños apreciados en el intestino fueron reacción inflamatoria y edema focal de la lámina propia, así como congestión a nivel de las vellosidades (1,2%).

En riñón anterior se registró congestión leve (1,2%) y en riñón posterior se presentó edema de los túbulos renales (2,4%).

En tejido gonadal se encontró severa hemorragia, congestión (1,2%) y necrosis de células espermáticas (1,2%).

No se exhibieron daños tisulares en el estómago, ciegos pilóricos, páncreas y músculo esquelético (2,4%).

Tabla 14. Hallazgos histopatológicos en tilapia *O. niloticus* infectada por *Citrobacter freundii* (n = 2).

Órgano	Lesión	Nº casos	Frecuencia %
Branquias	Ligera congestión de lamelas	1	1,2
	Edema focal	2	2,4
	Necrosis focal	1	1,2
Corazón	Pericardio		
	Pericarditis	1	1,2
	Aurícula		
	Severa reacción inflamatoria	1	1,2
	Edema endotelial	1	1,2
	Ventrículo		
	Severa reacción inflamatoria del miocardio	1	1,2
	Edema endotelial	1	1,2
	Estómago	Aparentemente normal	2
Hígado	Degeneración grasa	1	1,2
	Congestion de vasos	1	1,2
Bazo	Congestión severa	1	1,2
Intestino	Edema focal en la lámina propia	1	1,2
	Reacción inflamatoria focal en la lámina propia	1	1,2
	Congestión a nivel de las vellosidades	1	1,2
Ciegos pilóricos	Aparentemente normal	2	2,4
Páncreas	Aparentemente normal	2	2,4
Riñón anterior	Congestión leve	1	1,2
Riñón posterior	Túbulos renales edematosos	2	2,4
Gónada	Congestión severa	1	1,2
	Hemorragia severa	1	1,2
	Células espermáticas necróticas	1	1,2
Músculo esquelético	Aparentemente normal	2	2,4

5.1.7 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA BACTERIA *Plesiomonas shigelloides*

Se logró aislar 5 cepas bacterianas presuntivas a *P. shigelloides*, cuyas colonias en el medio TSA presentaron 0,5 a 2 mm de diámetro, color blanco cremoso, brillosas, bordes regulares y convexas (Figura 17). Asimismo dichas cepas crecieron en Agar EMB presentando conias de color ámbar, brillosas, bordes regulares y convexas (Figura 18)



Figura 17. Cultivo de *P. shigelloides* en agar TSA mostrando colonias de color blanco cremoso (flechas).



Figura 18. Cultivo de *P. shigelloides* en agar EMB mostrando colonias ámbar (flechas).

Las bacterias aisladas fueron visualizadas microscópicamente, observándose bastones de 0,8 – 1,0 micra de largo, Gram negativos, motiles, citocromo oxidasa positiva y fermentadores de glucosa, siendo características propias de la familia Enterobacteriaceae y dentro de ella se encuentra presumiblemente el género *Plesiomonas*.

CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS CON MÉTODO CONVENCIONAL

Las cepas estudiadas mediante pruebas convencionales reaccionaron positivamente ante las pruebas de indol y rojo de metilo. Las bacterias fueron corroboradas como negativas a la producción de hidrógeno sulfurado, citrato (Figura 19), Voges proskauer, manitol y lactosa (Tabla 15). Por otra parte, los aislados presentaron variabilidad a las pruebas de inositol y sorbitol.



Figura 19. *P. shigelloides* no reacciona ante la prueba de citrato.

Tabla 15. Características bioquímicas de la bacteria *Plesiomonas shigelloides* aislada de tilapia *Oreochromis niloticus*.

Pruebas bioquímicas	Cepas				
	9	10	11	12	13
Citocromo oxidasa	+	+	+	+	+
OF	F	F	F	F	F
Motilidad	+	+	+	+	+
Producción de indol	+	+	+	+	+
Producción de H ₂ S	-	-	-	-	-
Rojo de metilo	+	+	+	+	+
Voges Prokauer	-	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	-	-
TSI	K/A	K/A	K/A	K/A	K/A
Producción de ácido:					
Glucosa	+	+	+	+	+
Lactosa	-	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-
Inositol	-	+	+	-	-
Sorbitol	-	-	+	-	+

O: oxidación, F: fermentación, H₂S: Hidrógeno sulfurado, TSI: Agar hierro tres azúcares, K: alcalino, A: ácido.

CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS CON API 20 NE

Las cepas aisladas se identificaron correctamente como *P. shigelloides* mediante el sistema miniaturizado API 20 NE, obteniéndose el perfil numérico 7162744 (Figura 20), el cual correspondió a muy buen nivel de identificación (99,3%) (Tabla 16).

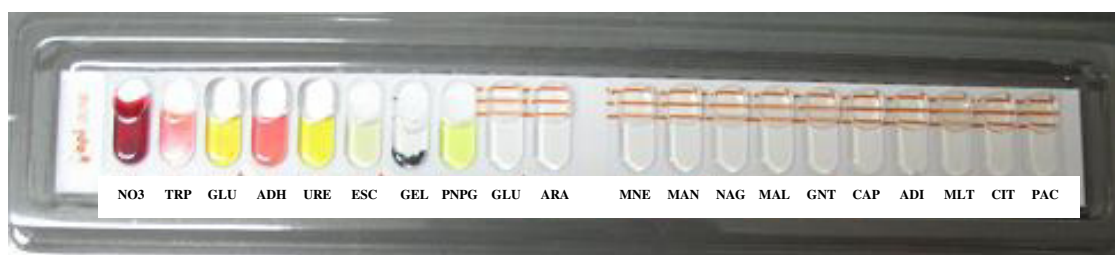


Figura 20. Reacción de la bacteria *P. shigelloides* en API 20 NE.

Tabla 16. Caracterización bioquímica mediante el Sistema API 20 NE de la bacteria *P. shigelloides* aislada de tilapia *Oreochromis niloticus*.

Pruebas	Abreviatura	Cepa 9	Cepa 10	Cepa 11	Cepa 12	Cepa 13
Oxidasa	OX	+	+	+	+	+
Reducción de nitratos	NO3	+	+	+	+	+
Producción de indol	IND	+	+	+	+	+
Acidificación de glucosa	GLU	+	+	+	+	+
Arginina dihidrolasa	ADH	+	+	+	+	+
Hidrólisis de úrea	URE	-	-	-	-	-
Hidrólisis de esculina	ESC	-	-	-	-	-
Hidrólisis de gelatina	GEL	-	-	-	-	-
Beta galactosidasa	PNPG	+	+	+	+	+
Pruebas de asimilación:						
Glucosa	GLU	+	+	+	+	+
Arabinosa	ARA	-	-	-	-	-
Manosa	MNE	+	+	+	+	+
Manitol	MAN	-	-	-	-	-
N Acetil glucosamina	NAG	+	+	+	+	+
Maltosa	MAL	+	+	+	+	+
Gluconato potásico	GNT	+	+	+	+	+
Ácido cáprico	CAP	-	-	-	-	-
Ácido adípico	ADI	-	-	-	-	-
Ácido málico	MLT	+	+	+	+	+
Citrato	CIT	-	-	-	-	-
Ácido fenilacético	PAC	-	-	-	-	-
Perfil numérico		7162744	7162744	7162744	7162744	7162744

5.1.8 SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA

Los antimicrobianos evaluados revelaron acción inhibitoria eficaz contra las cepas bacterianas de *P. shigelloides*, mostrando el 100% de las mismas, sensibilidad ante florfenicol, gentamicina y sulfatrimetoprim (Figura 16). Asimismo, se observó sensibilidad intermedia frente a kanamicina (60%).

El 80% de las bacterias presentaron resistencia a oxitetraciclina y el 60% a ácido nalidíxico. Los halos de inhibición de los antimicrobianos florfenicol y sulfatrimetoprim mostraron mayores dimensiones ante las cepas evaluadas (Tabla 17).

Tabla 17. Dimensiones de los halos de inhibición (milímetros) de los discos de susceptibilidad antimicrobiana ante las cepas de *P. shigelloides*.

Cepas	Florfenicol (30 µg)			Flumequina (30 µg)			Gentamicina (10 µg)			Kanamicina (30 µg)			Oxitetraciclina (30 µg)			Sulfatrimetoprim (25 µg)			Ácido nalidíxico (30 µg)		
	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}
9	40,0	39,0	39,5	29,0	28,0	28,5	16,0	15,5	15,8	14,0	13,2	13,6	14,0	14,3	14,2	33,0	33,4	33,2	21,0	20,0	20,5
10	32,5	32,0	32,3	24,0	23,5	23,8	15,0	14,8	14,9	16,5	16,0	16,3	12,5	13,0	12,8	25,5	25,8	25,7	9,0	9,3	9,2
11	39,0	38,2	38,6	24,0	24,6	24,3	18,5	18,0	18,3	21,5	21,0	21,3	8,0	7,0	7,5	28,5	28,0	28,3	14,5	14,3	14,4
12	30,0	29,0	29,5	20,5	21,0	20,8	18,0	17,8	17,9	17,0	16,7	16,9	11,0	11,5	11,3	25,0	24,4	24,7	11,5	11,0	11,3
13	35,0	34,5	34,8	6,0	7,0	6,5	15,5	15,2	15,4	18,0	17,6	17,8	19,0	18,7	18,9	25,0	24,8	24,9	6,0	6,2	6,1
Prom. Total			34,9			20,8			16,4			17,2			12,9			27,3			12,3

A1: Prueba 1; A2: Prueba 2

5.1.9 ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO

SIGNOS PATOLÓGICOS

Entre los principales signos externos se visualizó la presencia de eritema en aletas pectorales (5,9%), vientre (Figura 21) y ano (3,5%). Al evaluar los órganos internos se encontró congestión en hígado, intestino (4,7%) y gónada (2,4%), así como ascitis en la cavidad visceral (3,5%) (Tabla 18).



Figura 21. Eritema en zona pectoral y vientre (asteriscos).

Tabla 18. Frecuencia de manifestaciones clínicas en tilapia *Oreochromis niloticus* de la cual se aisló *Plesiomonas shigelloides* (n = 5).

Signos	Número de peces afectados	Frecuencia (%)
Externos		
Aletas pectorales eritematosas	5	5,9
Eritema en vientre	3	3,5
Eritema anal	3	3,5
Ano abultado	3	3,5
Descarga de fluido sanguinolento a través del ano	1	1,2
Descarga de fluido amarillento a través del ano	2	2,4
Internos		
Hígado inflamado	4	4,7
Vesícula biliar oscura	2	2,4
Intestino inflamado	4	4,7
Gónada congestionada	2	2,4
Ascitis	3	3,5

HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS

En cinco muestras de peces analizados se observó con mayor frecuencia a nivel de branquias, la presencia de congestión (4,7%) y edema focal (2,4%) en las lamelas secundarias (Tabla 19).

En tejido gástrico se halló reacción inflamatoria focal con células granulares eosinofílicas y linfocitos (3,5%), congestión focal de vasos sanguíneos y leve edema en la lámina propia con presencia de focos bacterianos (2,4%).

En el intestino se observó edema leve y congestión focal a nivel de la lámina propia (1,2%) (Figura 22); y presencia de necrosis licuefactiva en el ápice de las vellosidades (2,4%). Asimismo, se hallaron focos bacterianos en la lámina propia y tejido epitelial (1,2%).

El efecto patológico sobre el riñón anterior fue necrosis focal de tejido hematopoyético (Figura 23) y a nivel del riñón posterior nefrocalcinosis (1,2%).

En el tejido gonadal se halló necrosis focal de espermatoцитos (1,2%).

No se apreciaron lesiones en corazón, hígado, bazo, ciegos pilóricos, páncreas y músculo esquelético (5,8%).

Tabla 19. Hallazgos histopatológicos en tilapia *O. niloticus* infectada por *Plesiomonas shigelloides* (n = 5).

Órgano	Lesión	Nº casos	Frecuencia %
Branquias	Lamelas distorsionadas	2	2,4
	Edema focal	2	2,4
	Congestión focal	4	4,7
	Necrosis lamelas secundarias	2	2,4
	Aneurismas focales	1	1,2
	Trematodes monogeneos	1	1,2
Corazón	Aparentemente normal	5	5,8
Estómago	Severo edema de lámina propia	1	1,2
	Congestión focal de vasos sanguíneos en lámina propia	2	2,4
	Reacción inflamatoria focal con células granulos eosinofílicos y linfocitos	3	3,5
	Ligero edema de lámina propia	2	2,4
	Focos de bacterias	2	2,4
	Hígado	Aparentemente normal	5
Bazo	Aparentemente normal	5	5,8
Intestino	Leve edema y congestión focal de lámina propia	1	1,2
	Necrosis de enterocitos	1	1,2
	Reacción inflamatoria focal	1	1,2
	Desorganización estructural de lámina propia	2	2,4
	Severa necrosis licuefactiva del ápice de las vellosidades	2	2,4
	Focos bacterianos en la lámina propia y tejido epitelial	1	1,2
Ciegos pilóricos	Aparentemente normal	5	5,8
Páncreas	Aparentemente normal	5	5,8
Riñón anterior	Necrosis focal de tejido hematopoyético	1	1,2

(Continua)

Tabla 19. (continuación)

Órgano	Lesión	Nº casos	Frecuencia %
Riñón posterior	Nefrocalcinosis focal	1	1,2
Gónada	Desorganización estructural	1	1,2
	Necrosis focal de espermatocitos	1	1,2
	Severa necrosis de células espermáticas	1	1,2
	Congestión focal	1	1,2
Músculo esquelético	Aparentemente normal	5	5,8

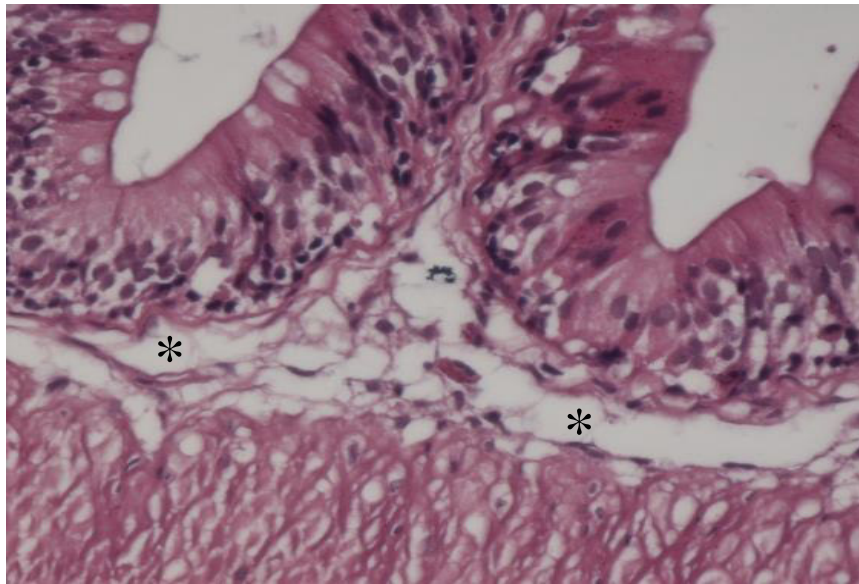


Figura 22. Tejido intestinal ligeramente edematoso a nivel de la lámina propia (asteriscos). Aumento: 60X.

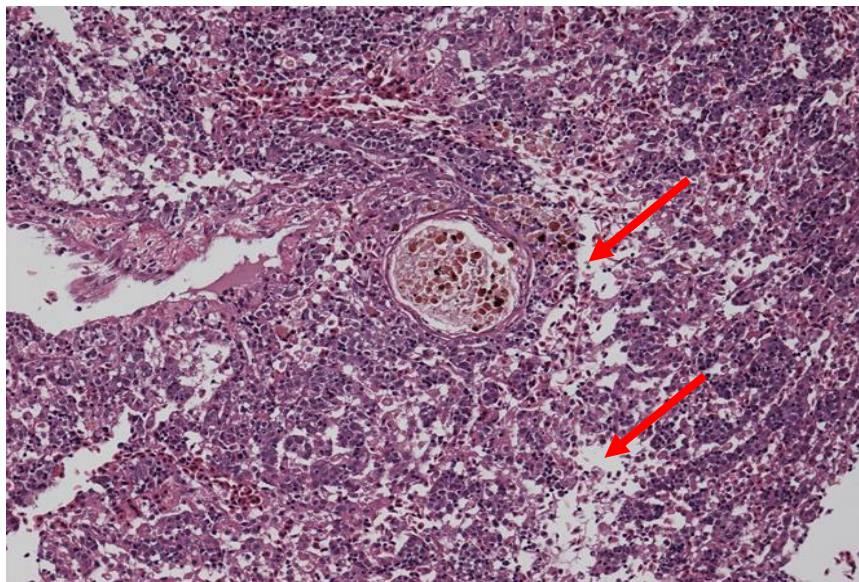


Figura 23. Riñón anterior con presencia de necrosis focal en tejido hematopoyético (flecha). Aumento: 20X.

5.2 FAMILIA VIBRIONACEAE

5.2.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA BACTERIA *Vibrio alginolyticus*

Se logró aislar 1 cepa bacteriana presuntiva a *Vibrio alginolyticus*, cuya propiedad cultural en el medio TCBS, exhibió colonias de 3 – 5 mm de diámetro, sacarosa positiva, brillosas, de bordes regulares y planas (Figura 24).

El patógeno bacteriano se visualizó microscópicamente, apreciándose bastones largos de 2 a 2,8 micras de longitud y al realizar el análisis presuntivo se observaron bacterias Gram negativas, motiles, citocromo oxidasa positiva con metabolismo fermentador de glucosa. Dichas características son propias de la familia Vibrionaceae y dentro de la misma se encuentra presumiblemente el género *Vibrio*.

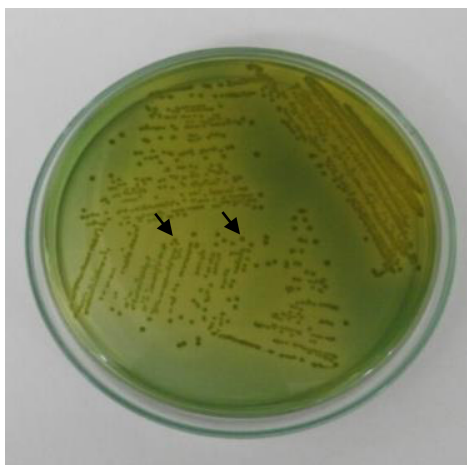


Figura 24. Cultivo de *V. alginolyticus* en el medio TCBS, exhibiendo colonias sacarosa positiva (flechas).

CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS CON MÉTODOS CONVENCIONALES

La cepa analizada mediante métodos convencionales reaccionó positivamente a las pruebas de citrato (Figura 25), rojo de metilo, indol, descarboxilación de lisina y generación de ácido en glucosa, manitol, inositol, sacarosa y sorbitol. También la bacteria fue ratificada como negativa a la

producción de hidrógeno sulfurado, Voges Proskauer y arginina dehidrolasa. Por otra parte, evidenció crecimiento en 1% y 3% de cloruro de sodio (Tabla 20) y fue sensible al agente vibriostático 0/129 (150 µg).



Figura 25. Reacción positiva de *V. alginolyticus* frente a la prueba de citrato.

Tabla 20. Características bioquímicas de la bacteria *Vibrio alginolyticus* aislada de tilapia *Oreochromis niloticus*.

Cepa 14	
Pruebas bioquímicas	
Citocromo oxidasa	+
OF	F
Motilidad	+
Producción de indol	+
Producción de H ₂ S	-
Rojo de metilo	+
Voges Prokauer	-
Citrato	+
TSI	A/A
Arginina dehidrolasa	-
Lisina descarboxilasa	+
Crecimiento en sales:	
0%	-
1%	+
3%	+
6%	-
8%	-
Sensibilidad a O/129 (150 µg)	S
Producción de ácido:	
Glucosa	+
Lactosa	-
Manitol	+
Inositol	+
Sacarosa	+
Sorbitol	+

O: oxidación, F: fermentación, H₂S: Hidrógeno sulfurado, TSI: Agar hierro tres azúcares, A: ácido, O/129: Agente vibriostático, S: Sensible

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA CON API 20 NE

La cepa aislada se identificó adecuadamente como *Vibrio alginolyticus*, estableciéndose el perfil numérico 7456704, el cual correspondió a muy buena identificación (99,3%) (Figura 26) (Tabla 21).

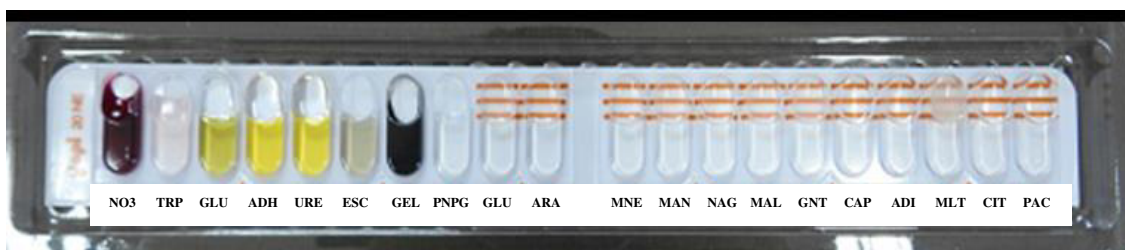


Figura 26. Reacción de la bacteria *Vibrio alginolyticus* en API 20 NE.

Tabla 21. Caracterización bioquímica mediante Sistema API 20 NE de la bacteria *Vibrio alginolyticus* aislada de tilapia *Oreochromis niloticus*.

Pruebas bioquímicas	Abreviatura	Cepa 14
Oxidasa	OX	+
Reducción de nitratos	NO3	+
Producción de indol	IND	+
Acidificación de glucosa	GLU	-
Arginina dihidrolasa	ADH	-
Hidrólisis de úrea	URE	-
Hidrólisis de esculina	ESC	+
Hidrólisis de gelatina	GEL	+
Beta galactosidasa	PNPG	-
Pruebas de asimilación:		
Glucosa	GLU	+
Arabinosa	ARA	-
Manosa	MNE	+
Manitol	MAN	+
N Acetil glucosamina	NAG	+
Maltosa	MAL	+
Gluconato potásico	GNT	+
Ácido cáprico	CAP	-
Ácido adípico	ADI	-
Ácido málico	MLT	-
Citrato	CIT	-
Ácido fenilacético	PAC	-
Perfil numérico		7456704

5.2.2 SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA

La cepa de *V. alginolyticus* presentó sensibilidad frente a la totalidad de antibióticos evaluados. Los halos de inhibición de los antimicrobianos florfenicol (32,8 mm) y flumequina presentaron mayores dimensiones ante la bacteria estudiada (Tabla 22).

Tabla 22. Dimensiones de los halos de inhibición (milímetros) de los discos de susceptibilidad antimicrobiana ante la bacteria *V. alginolyticus*.

Cepa	Florfenicol (30 µg)			Flumequina (30 µg)			Gentamicina (10 µg)			Kanamicina (30 µg)			Oxitetraciclina (30 µg)			Sulfatrimetoprim (25 µg)			Ácido nalidíxico (30 µg)		
	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}
	14	33,0	32,5	32,8	31,0	30,0	30,5	21,0	20,5	20,8	23,0	22,7	22,9	26,0	25,4	25,7	30,0	29,7	29,9	28,0	27,5

A1: Prueba 1; A2: Prueba 2

5.2.3 ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO

SIGNOS PATOLÓGICOS

Externamente se apreció eritema en el vientre y ano enrojecido (1,2%). Entre el signo interno se observó el hígado congestionado (1,2%) (Tabla 23).

Tabla 23. Frecuencia de aparición de signos externos e internos en tilapia *Oreochromis niloticus* de la cual se aisló *Vibrio alginolyticus* (n = 1).

Signos	Número de peces afectados	Frecuencia (%)
Externos		
Eritema en vientre	1	1,2
Ano enrojecido	1	1,2
Internos		
Hígado congestionado	1	1,2

HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS

El ejemplar analizado estuvo infectado por este patógeno y presentó a nivel de branquias severa hiperplasia del filamento primario, telangiectasia, congestión y necrosis focal de la lamela secundaria (Tabla 24).

En hígado se halló congestión focal y necrosis severa de hepatocitos.

A nivel de riñón anterior se apreció congestión y hemorragia en tejido hematopoyético.

No se encontraron daños tisulares en corazón, estómago, bazo, intestino, ciegos pilóricos, páncreas, riñón posterior, gónada y músculo esquelético.

Tabla 24. Hallazgos histopatológicos en tilapia *O. niloticus* infectada por *Vibrio alginolyticus* (n = 1).

Órgano	Lesión	Nº casos	Frecuencia %
Branquias	Severa hiperplasia del filamento primario	1	1,2
	Lamelas distorsionadas	1	1,2
	Telangiectasia focal	1	1,2
	Congestión y necrosis focal	1	1,2
Corazón	Aparentemente normal	1	1,2
Estómago	Aparentemente normal	1	1,2
Hígado	Congestión focal	1	1,2
	Necrosis severa de hepatocitos	1	1,2
Bazo	Aparentemente normal	1	1,2
Intestino	Aparentemente normal	1	1,2
Ciegos pilóricos	Aparentemente normal	1	1,2
Páncreas	Aparentemente normal	1	1,2
Riñón anterior	Congestión y hemorragia en tejido linfoide	1	1,2
Riñón posterior	Aparentemente normal	1	1,2
Gónada	Aparentemente normal	1	1,2
Músculo esquelético	Aparentemente normal	1	1,2

5.2.4 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA BACTERIA *Vibrio cholerae*

Se aisló 1 cepa bacteriana presuntiva a *Vibrio cholerae* a partir de agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS), cuyas colonias presentaron 2 – 3 mm de diámetro, sacarosa positiva, brillosas de bordes regulares y convexas (Figura 27).

Las bacterias aisladas fueron observadas microscópicamente, visualizándose bastones largos de 2,5 a 3 micras de longitud. Al efectuar las pruebas presuntivas se apreciaron bacterias Gram negativas, motiles, citocromo oxidasa positiva y con metabolismo fermentativo de glucosa. Dichas características bacteriológicas son inherentes a la familia Vibrionaceae y dentro de la misma presumiblemente el género *Vibrio*.

CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS CON EL MÉTODO CONVENCIONAL

La cepa analizada reaccionó positivamente a las pruebas de citrato, rojo de metilo, indol, descarboxilación de lisina, Voges Proskauer y produjo ácido en glucosa, sacarosa, sorbitol y manitol. La bacteria fue ratificada como negativa a la producción de hidrógeno sulfurado, arginina dehidrolasa. Por otra parte, evidenció crecimiento en 0%, 1% y 3% de cloruro de sodio y fue sensible al agente vibriostático 0/129 (150 µg) (Tabla 25).

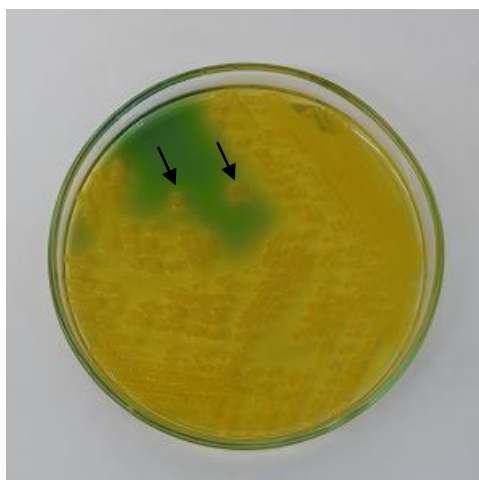


Figura 27. Cultivo de *V. cholerae* en el medio TCBS mostrando colonias de color amarillo, sacarosa positiva (flechas).

Tabla 25. Características bioquímicas de la bacteria *Vibrio cholerae* aislada de tilapia *Oreochromis niloticus*.

Pruebas bioquímicas	Cepa 15
Citocromo oxidasa	+
OF	F
Motilidad	+
Producción de indol	+
Producción de H ₂ S	-
Rojo de metilo	+
Voges Prokauer	+
Citrato	+
TSI	K/A
Arginina dehidrolasa	-
Lisina descarboxilasa	+
Crecimiento en sales:	
0%	+
1%	+
3%	+
6%	-
8%	-
Sensibilidad a O/129 (150 mg)	S
Producción de ácido:	
Glucosa	+
Lactosa	-
Manitol	+
Inositol	-
Sacarosa	+
Sorbitol	+

O: oxidación, F: fermentación, H₂S: Hidrógeno sulfurado, TSI: Agar hierro tres azúcares, K: alcalino, A: ácido, O/129: Agente vibriostático, S: Sensible

CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS CON API 20 NE

Mediante la utilización del Sistema API 20 NE, la cepa aislada se identificó correctamente como *Vibrio cholerae*, determinándose el perfil numérico 7074745, el cual correspondió a muy buena identificación (99%) (Tabla 26).

Tabla 26. Caracterización bioquímica mediante Sistema API 20 NE de la bacteria *Vibrio cholerae* aislada de tilapia *Oreochromis niloticus*.

Pruebas	Abreviatura	Cepa 15
Oxidasa	OX	+
Reducción de nitratos	NO3	+
Producción de indol	IND	+
Acidificación de glucosa	GLU	+
Arginina dihidrolasa	ADH	-
Hidrólisis de úrea	URE	-
Hidrólisis de esculina	ESC	-
Hidrólisis de gelatina	GEL	+
Beta galactosidasa	PNPG	+
Pruebas de asimilación:		
Glucosa	GLU	+
Arabinosa	ARA	-
Manosa	MNE	-
Manitol	MAN	+
N Acetil glucosamina	NAG	+
Maltosa	MAL	+
Gluconato potásico	GNT	+
Ácido cáprico	CAP	-
Ácido adípico	ADI	-
Ácido málico	MLT	+
Citrato	CIT	+
Ácido fenilacético	PAC	-
Perfil numérico		7074745

5.2.5 SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA

La cepa de *Vibrio cholerae* presentó sensibilidad frente a la totalidad de los antibióticos evaluados (Figura 28). Los halos de inhibición de los antimicrobianos florfenicol y oxitetraciclina exhibieron mayor tamaño ante la bacteria evaluada (Tabla 27).

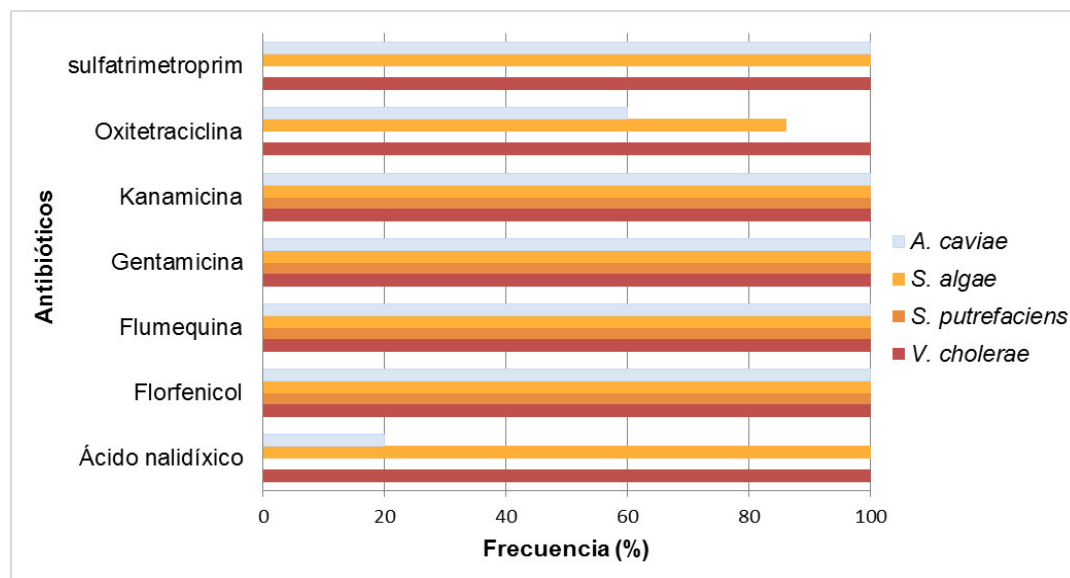


Figura 28. Frecuencia de sensibilidad antibiótica frente a las bacterias patógenas *A. caviae*, *S. algae*, *S. putrefaciens* y *V. cholerae* aisladas a partir de tilapias enfermas.

Tabla 27. Dimensiones de los halos de inhibición (milímetros) de los discos de susceptibilidad antimicrobiana ante la bacteria *Vibrio cholerae*.

Cepa	Florfenicol (30 µg)			Flumequina (30 µg)			Gentamicina (10 µg)			Kanamicina (30 µg)			Oxitetraciclina (30 µg)			Sulfatrimetoprim (25 µg)			Ácido nalidíxico (30 µg)		
	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}
15	48,0	47,8	47,9	32,0	32,8	32,4	23,0	23,6	23,3	21,5	20,8	21,2	50,0	51,0	50,5	44,5	43,9	44,2	44,0	43,2	43,6

A1: Prueba 1; A2: Prueba 2

5.2.6 ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO

SIGNOS PATOLÓGICOS

Los signos externos frecuentemente observados fueron eritema en vientre y ano (1,2%). Internamente se apreció el hígado e intestino congestionados (1,2%), así como el riñón anterior incrementado de tamaño (1,2%) (Tabla 28).

Tabla 28. Frecuencia de aparición de signos externos e internos en tilapia *Oreochromis niloticus* de la cual se aisló *Vibrio cholerae* (n = 1).

Signos	Número de peces Afectados	Frecuencia (%)
Externos		
Branquias levemente pálidas	1	1,2
Eritema en vientre	1	1,2
Eritema anal	1	1,2
Internos		
Hígado congestionado	1	1,2
Intestino congestionado	1	1,2
Ascitis	1	1,2

HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS

Las lesiones tisulares detectadas en el individuo afectado por el patógeno *V. cholerae* presentó a nivel de branquias congestión y aneurismas focales en las lamelas secundarias (1,2%) (Tabla 29).

En tejido cardíaco se observó pericarditis focal, severa reacción inflamatoria y edema a nivel de la aurícula y ventrículo (1,2%).

En estómago se halló edema focal de la lámina propia (1,2%).

En hígado se presentó congestión focal de vasos sanguíneos, necrosis de hepatocitos con cariólisis (Figura 29) y presencia de trombo fibrinoso (1,2%).

En el intestino se visualizó edema focal de la lámina propia y ligera congestión de los vasos sanguíneos (1,2%).

En tejido pancreático se reportó necrosis pancreática con pérdida de gránulos cimógenos (1,2%).

En riñón anterior se apreció ligera congestión (Figura 30) y necrosis focal. A nivel del riñón posterior se observó necrosis focal en túbulo renales (1,2%).

En bazo, ciegos pilóricos, tejido gonadal y músculo esquelético no se presentaron daños tisulares (1,2%).

Tabla 29. Hallazgos histopatológicos en tilapia *O. niloticus* infectada por *Vibrio cholerae* (n = 1).

Órgano	Lesión	Nº casos	Frecuencia %
Branquias	Aneurismas focales	1	1,2
	Congestión focal de lamelas	1	1,2
	Edema focal	1	1,2
	Trematodes monogéneos	1	1,2
Corazón	Pericardio		
	Pericarditis focal	1	1,2
	Aurícula		
	Severa reacción inflamatoria	1	1,2
	Severo edema	1	1,2
	Ventrículo		
	Severa reacción inflamatoria	1	1,2
	Edema focal del endotelio	1	1,2
	Estómago	Edema focal de lámina propia	1
Hígado	Necrosis focal de hepatocitos	1	1,2
	Hemorragia focal	1	1,2
	Cariolisis	1	1,2
	Edema focal	1	1,2
	Congestión focal de vasos sanguíneos	1	1,2

(Continua)

Tabla 29. (continuación)

Órgano	Lesión	Nº casos	Frecuencia %
Hígado	Trombo fibrinoso	1	1,2
Bazo	Aparentemente normal	1	1,2
Intestino	Ligera congestión	1	1,2
	Edema focal de lámina propia	1	1,2
Ciegos pilóricos	Aparentemente normal	1	1,2
Páncreas	Necrosis pancreática con pérdida de gránulos cimógenos	1	1,2
Riñón anterior	Ligera congestión	1	1,2
	Necrosis focal	1	1,2
Riñón posterior	Necrosis focal en túbulos renales	1	1,2
	Desorganización estructural	1	1,2
Gónada	Aparentemente normal	1	1,2
Músculo esquelético	Aparentemente normal	1	1,2

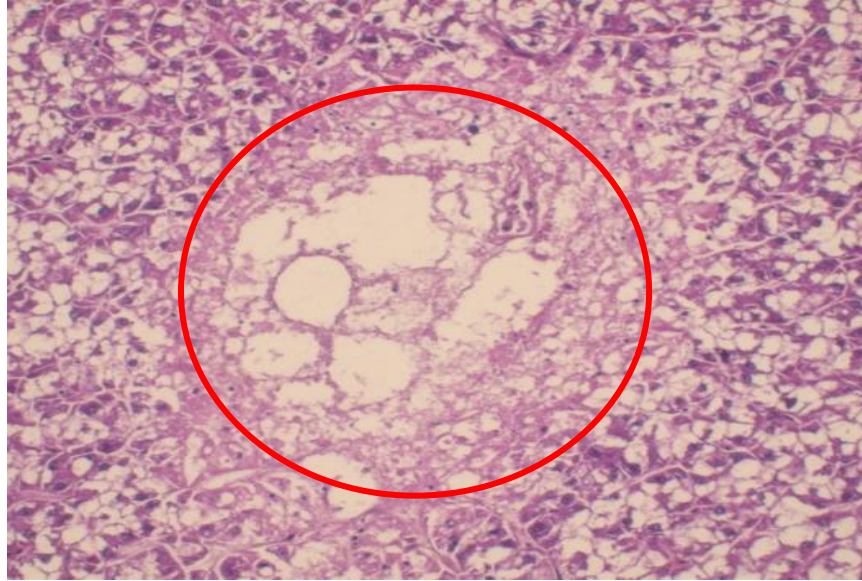


Figura 29. Necrosis focal de hepatocitos de tipo licuefactiva en tejido hepático (círculo). Aumento: 40X.

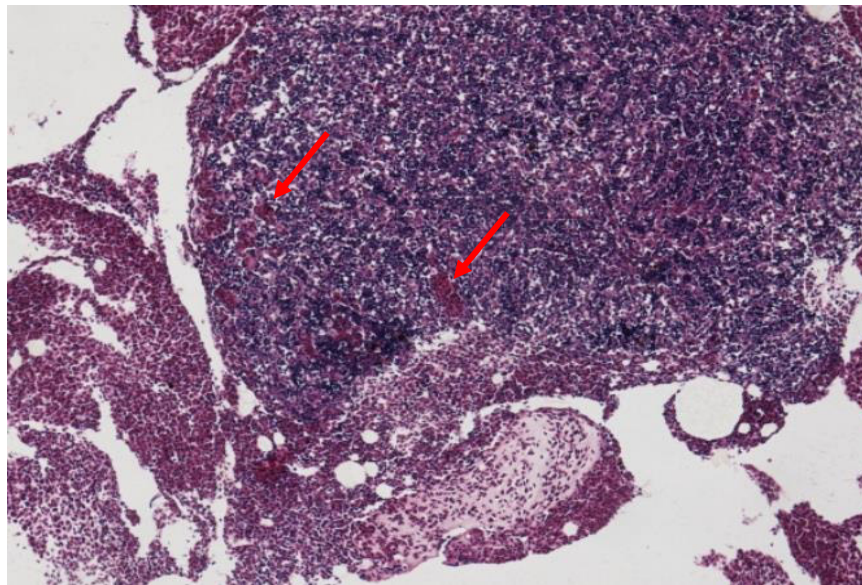


Figura 30. Ligera congestión en riñón anterior (flechas). Aumento: 10X.

5.3 FAMILIA SHEWANELACEAE

5.3.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA BACTERIA *Shewanella putrefaciens*

Se logró aislar 1 cepa presuntiva a *S. putrefaciens*, cuya propiedad cultural en agar TSA evidenció la presencia de colonias de 2 mm. de diámetro, color salmón, brillosas, bordes regulares, convexas y de consistencia ligosa.

Al efectuar el análisis microscópico de las bacterias aisladas, se visualizaron bastones cortos de 1,5 a 2 micras de largo. Al realizar las pruebas presuntivas se apreciaron bacterias Gram negativas, motiles, citocromo oxidasa positiva y metabólicamente no fermentadoras de glucosa. Dichas características bacteriológicas son peculiares de la familia Shewanellaceae y dentro de ella se encuentra presumiblemente el género *Shewanella*.

CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS CON MÉTODOS CONVENCIONALES

La cepa evaluada fue positiva a la producción de hidrógeno sulfurado y ácido a partir de maltosa. Asimismo, fue ratificada como negativa a las pruebas de indol, rojo de metilo, citrato, glucosa, lactosa (Figura 31), manitol, inositol y sorbitol (Tabla 30).



Figura 31. Reacción negativa de *S. putrefaciens* ante la prueba de lactosa.

Tabla 30. Características bioquímicas de la bacteria *Shewanella putrefaciens* aislada de tilapia *Oreochromis niloticus*.

Pruebas bioquímicas	Cepa 16
Citocromo oxidasa	+
OF	-
Motilidad	+
Producción de indol	-
Producción de H ₂ S	+
Rojo de metilo	-
Voges Prokaüer	+
Citrato	-
TSI	K/-
Producción de ácido:	
Glucosa	-
Lactosa	-
Manitol	-
Inositol	-
Sorbitol	-
Maltosa	+

O: oxidación, F: fermentación, H₂S: Hidrógeno sulfurado, TSI: Agar hierro tres azúcares, K: alcalino

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA CON API 20 NE

La cepa aislada se identificó apropiadamente como *Shewanella putrefaciens* mediante el sistema API 20 NE, estableciéndose el perfil numérico 1410154, el cual correspondió a una excelente identificación (99,9%) (Figura 32) (Tabla 31).

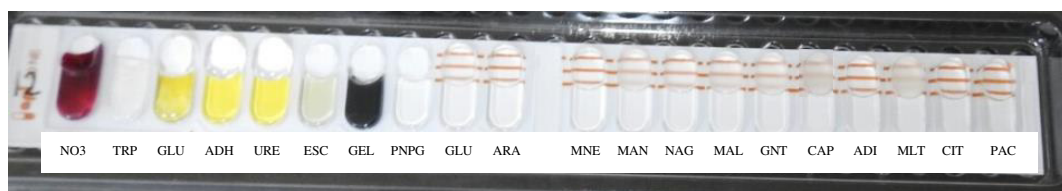


Figura 32. Reacción de la bacteria *Shewanella putrefaciens* en API 20 NE.

Tabla 31. Caracterización bioquímica mediante Sistema API 20 NE de la bacteria *Shewanella putrefaciens* aislada de tilapia *Oreochromis niloticus*.

Pruebas	Abreviatura	Cepa 16
Oxidasa	OX	+
Reducción de nitratos	NO3	+
Producción de indol	IND	-
Acidificación de glucosa	GLU	-
Arginina dihidrolasa	ADH	-
Hidrólisis de úrea	URE	-
Hidrólisis de esculina	ESC	+
Hidrólisis de gelatina	GEL	+
Beta galactosidasa	PNPG	-
Pruebas de asimilación:		
Glucosa	GLU	-
Arabinosa	ARA	-
Manosa	MNE	-
Manitol	MAN	-
N Acetil glucosamina	NAG	+
Maltosa	MAL	-
Gluconato potásico	GNT	-
Ácido cáprico	CAP	+
Ácido adípico	ADI	-
Ácido málico	MLT	+
Citrato	CIT	-
Ácido fenilacético	PAC	-
Perfil numérico		1410154

5.3.2 SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA

Shewanella putrefaciens mostró sensibilidad antibiótica frente a florfenicol, flumequina, gentamicina y kanamicina (100%), presentando resistencia frente a ácido nalidíxico, oxitetraciclina y sulfatrimetoprim (100%). Los halos de inhibición de los antimicrobianos florfenicol y flumequina mostraron mayor tamaño ante la cepa estudiada (Tabla 32).

Tabla 32. Dimensiones de los halos de inhibición (milímetros) de los discos de susceptibilidad antimicrobiana ante la bacteria *S. putrefaciens*.

Cepa	Florfenicol (30 µg)			Flumequina (30 µg)			Gentamicina (10 µg)			Kanamicina (30 µg)			Oxitetraciclina (30 µg)			Sulfatrimetoprim (25 µg)			Ácido nalidíxico (30 µg)		
	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}
16	48,0	47,5	47,8	40,0	39,8	39,9	29,0	28,7	28,9	30,0	29,5	29,8	12,0	13,5	12,8	6,0	5,5	5,8	6,0	6,8	6,4

A1: Prueba 1; A2: Prueba 2

5.3.3 ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO

SIGNOS PATOLÓGICOS

Externamente se observaron lesiones eritematosas en las aletas pectorales y alrededor del ano (1,2%). Entre los signos internos se apreciaron el hígado y gónada congestionados y presencia de ascitis en la cavidad visceral (1,2%) (Tabla 33).

Tabla 33. Frecuencia de manifestaciones clínicas en tilapia *Oreochromis niloticus* de la cual se aisló *Shewanella putrefaciens* (n = 1).

Signos	Número de peces Afectados	Frecuencia (%)
Externos		
Eritema de aletas pectorales	1	1,2
Eritema alrededor del ano	1	1,2
Internos		
Hígado congestionado	1	1,2
Gónadas hemorrágicas	1	1,2
Ascitis	1	1,2

HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS

De las muestras estudiadas, se halló un ejemplar afectado por el patógeno *Sh. putrefaciens*, la cual presentó en tejido branquial, aneurismas y ligera congestión focal (1,2%) (Tabla 34).

En hígado se halló ligera congestión de capilares sinusoides y necrosis focal de hepatocitos con núcleos picnóticos (1,2%).

En tejido esplénico se visualizó congestión focal y necrosis de tejido hematopoyético a nivel del parénquima y cápsula (1,2%).

En el riñón anterior se apreció tejido necrótico focalizado y hemorragia (Figura 33). En el riñón posterior se observó edema focal peritubular, ligera congestión y necrosis de tejido hematopoyético (1,2%).

En gónadas se halló severa necrosis de tejido espermático, congestión de vasos sanguíneos (Figura 34) y hemorragia (1,2%).

En corazón, estómago, intestino, ciegos pilóricos, páncreas y músculo esquelético no se observaron lesiones tisulares (1,2%).

Tabla 34. Hallazgos histopatológicos en tilapia *O. niloticus* infectada por *Shewanella putrefaciens* (n = 1).

Órgano	Lesión	Nº casos	Frecuencia %
Branquias	Aneurismas focales	1	1,2
	Ligera congestión	1	1,2
Corazón	Aparentemente normal	1	1,2
Estómago	Aparentemente normal	1	1,2
Hígado	Congestión focal	1	1,2
	Necrosis de hepatocitos	1	1,2
Bazo	Congestión focal y necrosis de tejido hematopoyético en parénquima	1	1,2
	Congestión focal y necrosis de tejido hematopoyético en cápsula con CGE	1	1,2
Intestino	Aparentemente normal	1	1,2
Ciegos pilóricos	Aparentemente normal	1	1,2
Páncreas	Aparentemente normal	1	1,2
Riñón anterior	Necrosis focal	1	1,2
	Hemorragia focal	1	1,2
	Núcleos picnóticos	1	1,2
Riñón posterior	Necrosis focal de tejido hematopoyético	1	1,2
	Edema focal peritubular	1	1,2
	Ligera congestión	1	1,2
Gónada	Necrosis severa de folículos gonadales	1	1,2
	Hemorragia y congestión de vasos sanguíneos	1	1,2
Músculo esquelético	Aparentemente normal	1	1,2

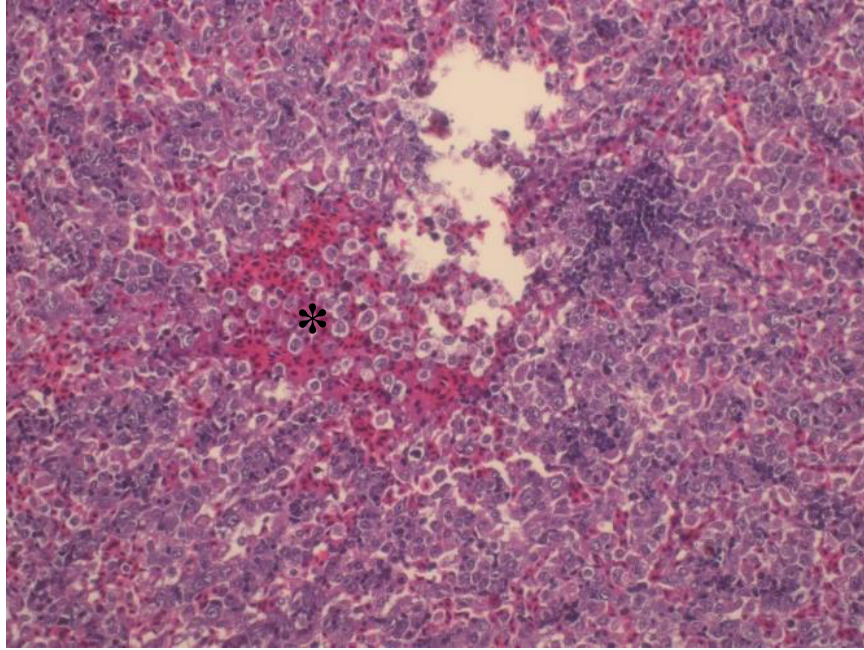


Figura 33. Riñón anterior con necrosis focal y hemorragia (asterisco). Aumento: (40X).

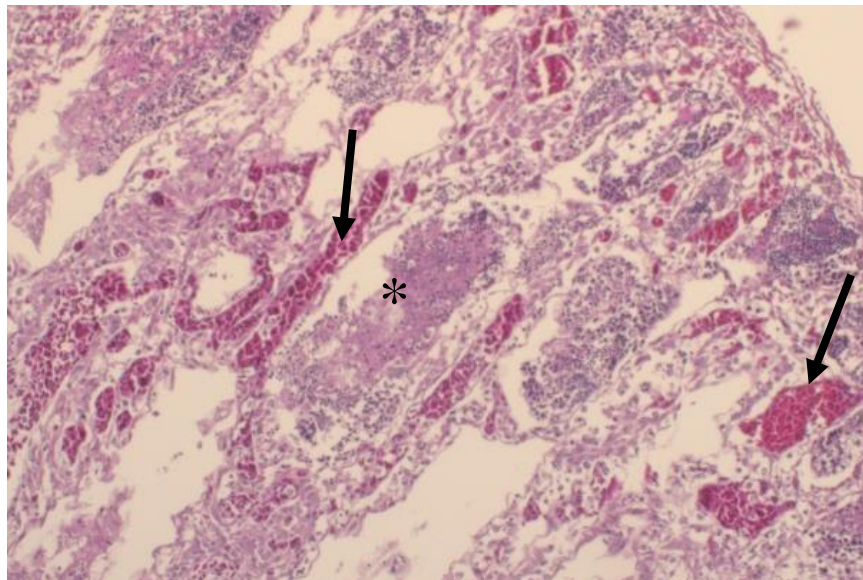


Figura 34. Necrosis de tejido espermático (asterisco) y congestión de vasos sanguíneos (flechas) en tejido gonadal. Aumento: 20X.

5.3.4 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA BACTERIA *Shewanella algae*

Se aislaron 7 cepas presuntivas a *S. algae*, cuyas colonias en agar TSA presentaron 0,5 a 3 mm. de diámetro, color salmón, brillosas, bordes regulares, convexas y de consistencia ligosa (Figura 35).

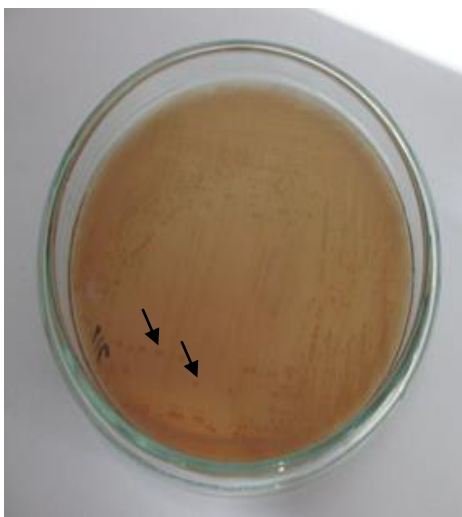


Figura 35. Cultivo de *S. algae* en agar tripticasa de soya exhibiendo colonias de color salmón (flechas).

Las bacterias aisladas fueron observadas microscópicamente, visualizándose bastones cortos de 1 a 2 micras de largo. Al efectuar las pruebas presuntivas se apreciaron bacterias Gram negativas, motiles, citocromo oxidasa positiva y metabólicamente no fermentadoras de glucosa. Dichas características bacteriológicas son propias de la familia Shewanellaceae y en la misma se involucra presumiblemente el género *Shewanella*.

CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS CON MÉTODOS CONVENCIONALES

Las cepas estudiadas fueron positivas a la producción de hidrógeno sulfurado y resultaron negativas a la producción de indol, citrato, Voges Proskauer, lactosa, rojo de metilo, manitol, inositol, sorbitol y maltosa (Tabla 35).

Tabla 35. Características bioquímicas de la bacteria *Shewanella algae* aislada de tilapia *Oreochromis niloticus*.

Pruebas bioquímicas	Cepas							
	17	18	19	20	21	22	23	
Citocromo oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	
OF	-	-	-	-	-	-	-	
Motilidad	+	+	+	+	+	+	+	
Producción de indol	-	-	-	-	-	-	-	
Producción de H ₂ S	+	+	+	+	+	+	+	
Rojo de metilo	-	-	-	-	-	-	-	
Voges Prokauer	-	-	-	-	-	-	-	
Citrato	-	-	-	-	-	-	-	
TSI	K/-	K/-	K/-	K/-	K/-	K/-	K/-	
Producción de ácido:								
Glucosa	-	-	-	-	-	-	-	
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	
Manitol	-	-	-	-	-	-	-	
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	
Maltosa	-	-	-	-	-	-	-	

O: oxidación, F: fermentación, H₂S: Hidrógeno sulfurado, TSI: Agar hierro tres azúcares, K: alcalino

CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS CON API 20 E

Mediante el uso del sistema API 20 E, las cepas aisladas se identificaron como *Shewanella putrefaciens*, determinándose el perfil numérico 0400004, el cual correspondió a una buena identificación (89%) (Figura 36) (Tabla 36).

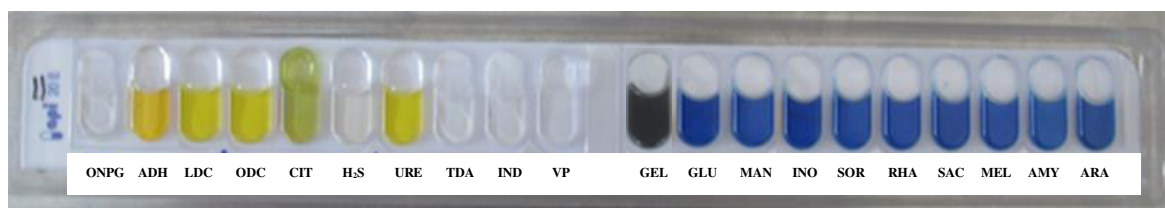


Figura 36. Reacción de la bacteria *Shewanella putrefaciens* en API 20 E.

Tabla 36. Caracterización bioquímica mediante el Sistema API 20 E de la bacteria *S. algae* aislada de tilapia *O. niloticus*.

Pruebas bioquímicas	Abreviatura	Cepa 17	Cepa 18	Cepa 19	Cepa 20	Cepa 21	Cepa 22	Cepa 23
Citocromo oxidasa	OX	+	+	+	+	+	+	+
Beta galactosidasa	PNPG	-	-	-	-	-	-	-
Arginina dihidrolasa	ADH	-	-	-	-	-	-	-
Descarboxilación de lisina	LDC	-	-	-	-	-	-	-
Descarboxilación de ornitina	ODC	-	-	-	-	-	-	-
Citrato	CIT	-	-	-	-	-	-	-
Producción de hidrógeno sulfurado	H2S	+	+	+	+	+	+	+
Ureasa	URE	-	-	-	-	-	-	-
Desaminación de triptófano	TDA	-	-	-	-	-	-	-
Producción de indol	IND	-	-	-	-	-	-	-
Voges Proskauer	VP	-	-	-	-	-	-	-
Gelatinasa	GEL	-	-	-	-	-	-	-
Producción de ácido:								
Glucosa	GLU	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	MAN	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	INO	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	SOR	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnosa	RHA	-	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	SAC	-	-	-	-	-	-	-
Melobiosa	MEL	-	-	-	-	-	-	-
Amigdalina	AMY	-	-	-	-	-	-	-
Arabinosa	ARA	-	-	-	-	-	-	-
Perfil numérico		400004	400004	400004	400004	400004	400004	400004

5.3.5 SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA

El 100% de las cepas de *Shewanella algae* evidenciaron sensibilidad frente a florfenicol, flumequina, gentamicina, kanamicina, sulfatrimetroprim y ácido nalidixico. Asimismo, el 14% de las cepas revelaron sensibilidad intermedia ante oxitetraciclina. Los halos de inhibición de los antimicrobianos florfenicol y ácido nalidíxico mostraron mayores dimensiones ante las cepas evaluadas (Tabla 37).

Tabla 37. Dimensiones de los halos de inhibición (milímetros) de los discos de susceptibilidad antimicrobiana ante las cepas de *S. algae*.

Cepas	Florfenicol (30 µg)			Flumequina (30 µg)			Gentamicina (10 µg)			Kanamicina (30 µg)			Oxitetraciclina (30 µg)			Sulfatrimetroprim (25 µg)			Ácido nalidíxico (30 µg)		
	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}
17	49,0	48,8	48,9	32,2	32,0	32,1	20,5	20,0	20,3	25,5	28,0	26,8	40,0	41,0	40,5	31,5	31,0	31,3	49,0	47,8	48,4
18	38,0	37,5	37,8	40,0	39,8	39,9	16,0	16,4	16,2	26,0	25,8	25,9	38,0	37,4	37,7	32,0	31,6	31,8	40,0	39,5	39,8
19	31,0	31,2	31,1	26,5	26,0	26,0	22,5	21,5	22,0	22,0	21,5	21,8	15,0	16,5	15,8	21,5	21,8	21,7	24,0	24,8	24,4
20	33,0	32,5	32,8	31,0	30,5	31,0	22,7	22,5	22,6	22,2	22,0	22,1	26,0	24,9	25,5	28,2	27,5	27,9	31,2	30,0	30,6
21	48,0	47,8	47,9	27,0	26,5	26,8	17,5	17,0	17,3	24,5	24,9	24,7	41,0	40,0	40,5	38,5	39,0	38,8	42,5	41,3	41,9
22	41,0	41,5	41,3	34,0	33,9	34,0	18,0	18,6	18,3	28,0	27,6	27,8	35,0	34,7	34,9	36,0	36,5	36,3	36,0	35,5	35,8
23	46,0	46,3	46,2	22,0	21,7	21,9	20,0	19,7	19,9	18,0	17,8	17,9	38,0	37,8	37,9	37,0	36,7	36,9	36,0	36,5	36,3
Prom. Total			40,8			30,2			19,5			23,8			33,2			32,1			36,7

A1: Prueba 1; A2: Prueba 2

5.3.6 ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO

SIGNOS PATOLÓGICOS

Los signos externos comúnmente apreciados fueron eritema en el poro urogenital (4,7%) y en las aletas pectorales (2,4%). Al observar los órganos internos se encontró congestión intestinal (4,7%), gónadas hemorrágicas y ascitis en la cavidad visceral (3,5%) (Tabla 38).

Tabla 38. Frecuencia de manifestaciones clínicas en tilapia *Oreochromis niloticus* de la cual se aisló *S. algae* (n = 7).

Signos	Número de peces Afectados	Frecuencia (%)
Externos		
Exoftalmia bilateral	2	2,4
Boca enrojecida	1	1,2
Branquias pálidas	1	1,2
Eritema de aletas pectorales	2	2,4
Eritema de poro urogenital	4	4,7
Poros urogenital abultado	4	4,7
Descarga de fluido sanguinolento a través del ano	1	1,2
Internos		
Hígado pálido	2	2,4
Hígado hemorrágico	3	3,5
Vesícula biliar oscura	2	2,4
Intestino congestionado	4	4,7
Fluido sanguinolento en intestino	1	1,2
Gónadas hemorrágicas	3	3,5
Vejiga natatoria hemorrágica	1	1,2
Ascitis	3	3,5

HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS

En siete individuos de los cuales se aisló la bacteria *S. algae*, se observó con mayor frecuencia a nivel de branquias, la presencia de hiperplasia interlamelar (2,4%) y en menor proporción aneurismas, congestión focal y distorsión de las lamelas secundarias (1,2%) (Tabla 39).

En tejido cardiaco se apreció pericarditis focal, leve edema endotelial a nivel de la aurícula y ventrículo, así como severa reacción inflamatoria focal en el miocardio del mismo (1,2%) (Figura 37).

En estómago se encontró desprendimiento del epitelio y necrosis focal de tejido glandular (1,2%).

En tejido hepático se halló ligera congestión de capilares sinusoides (3,5%) y necrosis focal de hepatocitos de tipo licuefactiva (2,4%) (Figura 38).

En el bazo se visualizó ligera congestión (3,5%) y edema focal con hemorragia difusa (1,2%).

En el intestino se apreció severa reacción inflamatoria de la lámina propia (4,7%) y severa necrosis de tipo licuefactiva con pérdida de vellosidades intestinales (1,2%).

En riñón anterior se halló congestión focal (1,2%) y ligero edema de tejido hematopoyético (1,2%).

En tejido gonadal se presentó severa congestión y necrosis de folículos gonadales (3,5%).

Los ciegos pilóricos, páncreas, riñón posterior y músculo esquelético se observaron aparentemente normales (8,2%).

Tabla 39. Hallazgos histopatológicos en tilapia *O. niloticus* infectada por *Shewanella algae* (n = 7)

Órgano	Lesión	Nº casos	Frecuencia %
Branquias	Hiperlasia interlamelar	2	2,4
	Fusión de lamelas focales	1	1,2
	Congestión focal de lamelas	1	1,2
	Aneurismas focales	1	1,2
	Engrosamiento del filamento primario	1	1,2
	Lamelas secundarias distorsionadas	1	1,2
Corazón	Pericardio		
	Pericarditis focal	1	1,2
	Aurícula		
	Leve edema del endotelio	1	1,2
	Ventrículo		
	Severa reacción inflamatoria focal del miocardio	1	1,2
	Edema focal del endotelio	1	1,2
Estómago	Desprendimiento de epitelio y necrosis focal	1	1,2
Hígado	Congestión focal	3	3,5
	Gránulos en hepatocitos	1	1,2
	Necrosis focal de tipo licuefactiva	2	2,4
	Picnosis nuclear de hepatocitos	1	1,2
Bazo	Hemorragia difusa	1	1,2
	Edema focal	1	1,2
	Ligera congestión	3	3,5
Intestino	Severa necrosis de tipo licuefactiva con pérdida de vellosidades intestinales y lámina propia	1	1,2
	Necrosis focal de vellosidades intestinales	1	1,2
	Severa reacción inflamatoria: Enteritis	4	4,7
Ciegos pilóricos	Aparentemente normal	7	8,2
Páncreas	Aparentemente normal	7	8,2

(Continua)

Tabla 39. (continuación)

Órgano	Lesión	Nº casos	Frecuencia %
Riñón anterior	Ligero edema en tejido hematopoyético	1	1,2
	Congestión focal	1	1,2
Riñón posterior	Aparentemente normal	7	8,2
Gónada	Severa congestión	3	3,5
	Necrosis de folículos gonadales	3	3,5
Músculo esquelético	Aparentemente normal	7	8,2

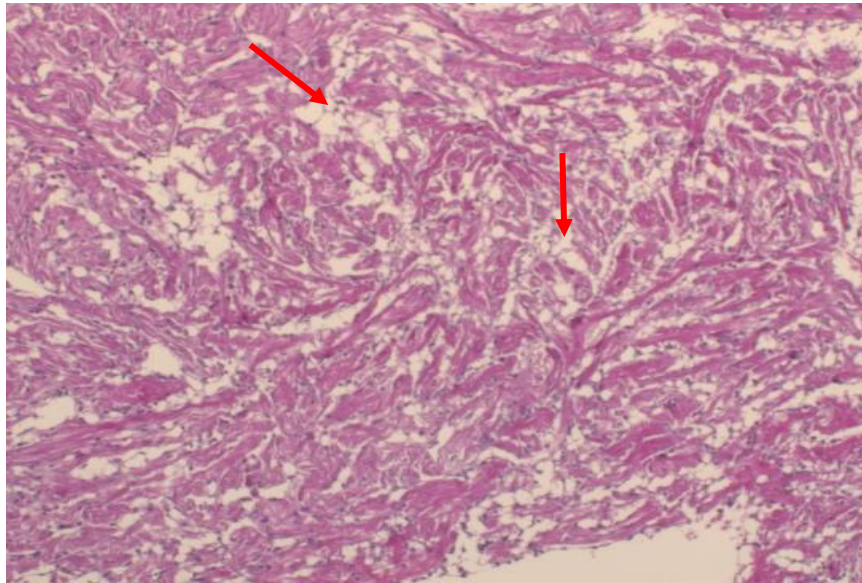


Figura 37. Severa reacción inflamatoria focal en el músculo miocárdico del ventrículo cardiaco (flechas). Aumento: 20X.

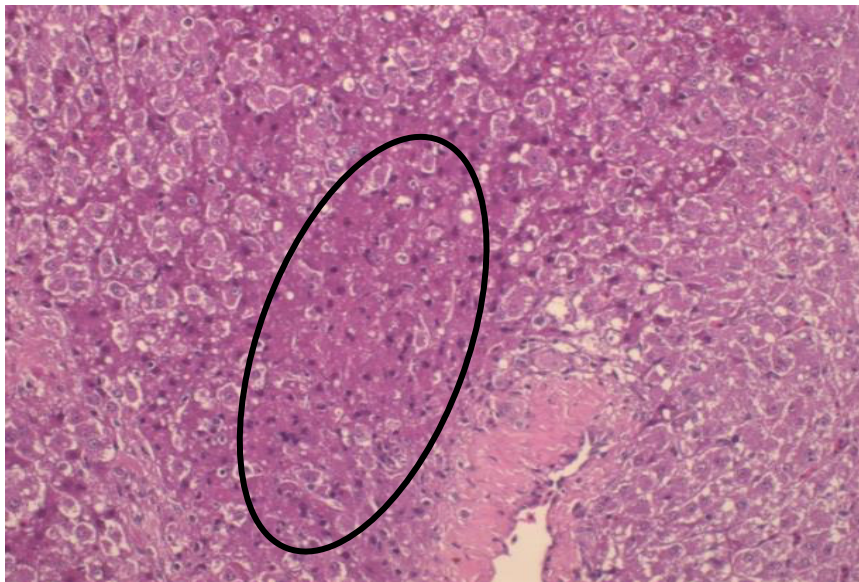


Figura 38. Necrosis focal de hepatocitos de tipo licuefactiva en el hígado (círculo). Aumento: 40X.

5.4 FAMILIA AEROMONADACEAE

5.4.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA BACTERIA *Aeromonas caviae*

Se aislaron 5 cepas bacterianas presuntivas a *A. caviae*, cuyas propiedades culturales en agar TSA mostraron colonias de 1 a 2 mm. de diámetro, color blanco cremoso, brillosas, bordes regulares y convexas (Figura 39). Asimismo en el medio diferencial Agar Glutamato (GSP) para *Aeromonas* se observaron colonias de color amarillo, brillosas, bordes regulares y convexas (Figura 40).

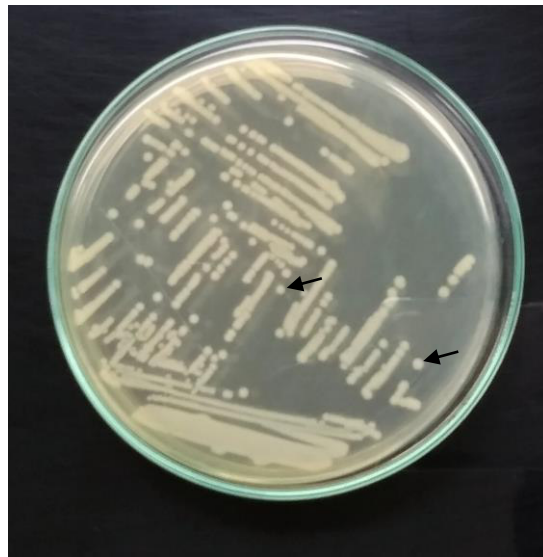


Figura 39. Cultivo de *A. caviae* en agar TSA evidenciando colonias de color blanco cremoso (flechas).

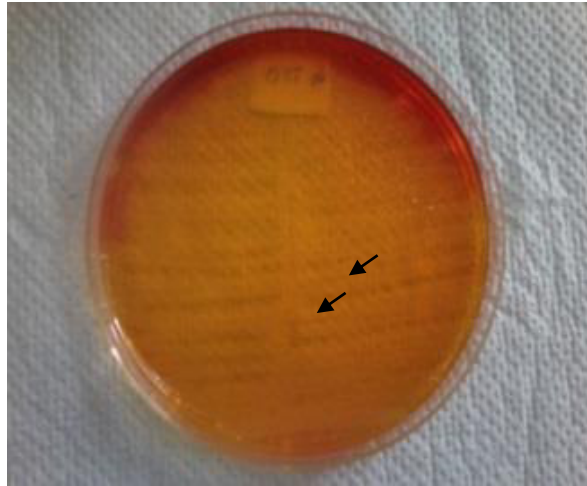


Figura 40. Cultivo de *A. caviae* en agar GSP exhibiendo colonias de color amarillo (flechas).

Las bacterias aisladas fueron visualizadas al microscopio, apreciándose bastones de 1 a 3,5 μm . Al efectuar las pruebas presuntivas se observaron bacterias Gram negativas, motiles, citocromo oxidasa positiva y con metabolismo fermentador de glucosa. Dichas características bacteriológicas son inherentes a la familia Aeromonadaceae y en la misma se involucra presumiblemente el género *Aeromonas*.

CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS CON MÉTODOS CONVENCIONALES

Las cepas evaluadas mostraron reacciones positivas a las pruebas de citrato, rojo de metilo, manitol, sorbitol y producción de indol (Figura 41). Por otro lado, fueron corroboradas como negativas a la prueba de Voges Proskauer, producción de hidrógeno sulfurado, inositol y lactosa (Tabla 40).



Figura 41. Reacción positiva de *Aeromonas caviae* ante la prueba de indol.

Tabla 40. Características bioquímicas de la bacteria *Aeromonas caviae* aislada de tilapia *Oreochromis niloticus*.

Pruebas bioquímicas	Cepas				
	24	25	26	27	28
Citocromo oxidasa	+	+	+	+	+
OF	F	F	F	F	F
Motilidad	+	+	+	+	+
Producción de indol	+	+	+	+	+
Producción de H ₂ S	-	-	-	-	-
Rojo de metilo	+	+	+	+	+
Voges Prokauer	-	-	-	-	-
Citrato	+	+	+	+	+
TSI	K/A	K/A	K/A	K/A	K/A
Producción de ácido:					
Glucosa	+	+	+	+	+
Lactosa	-	-	-	-	-
Manitol	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-
Sorbitol	+	+	+	+	+

O: oxidación, F: fermentación, H₂S: Hidrógeno sulfurado, TSI: Agar hierro tres azúcares, K: alcalino, A: ácido

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA CON API 20 NE

Las cepas bacterianas aisladas fueron tipificadas mediante este sistema como *Aeromonas caviae* / *A. hydrophila*, determinándose en 3 cepas el perfil numérico 7577755 (Figura 42) con muy buen nivel de identificación (99,3%) y en 2 cepas el perfil 7575755 con una excelente identificación (99.9%) (Tabla 41).

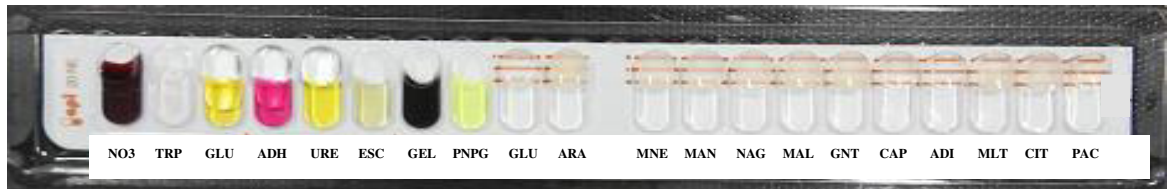


Figura 42. Reacción de la bacteria *Aeromonas caviae* / *A. hydrophila* en API 20 NE.

Tabla 41. Caracterización bioquímica mediante el Sistema API 20 NE de la bacteria *Aeromonas caviae* aislada de tilapia *Oreochromis niloticus*.

Pruebas	Abreviatura	Cepa 24	Cepa 25	Cepa 26	Cepa 27	Cepa 28
Oxidasa	OX	+	+	+	+	+
Reducción de nitratos	NO3	+	+	+	+	+
Producción de indol	IND	+	+	+	+	+
Acidificación de glucosa	GLU	+	+	+	+	+
Arginina dihidrolasa	ADH	+	+	+	+	+
Hidrólisis de úrea	URE	-	-	-	-	-
Hidrólisis de esculina	ESC	+	+	+	+	+
Hidrólisis de gelatina	GEL	+	+	+	+	+
Beta galactosidasa	PNPG	+	+	+	+	+
Pruebas de asimilación:						
Glucosa	GLU	+	+	+	+	+
Arabinosa	ARA	+	+	+	+	+
Manosa	MNE	+	+	-	+	-
Manitol	MAN	+	+	+	+	+
N Acetil glucosamina	MAG	+	+	+	+	+
Maltosa	MAL	+	+	+	+	+
Gluconato potásico	GNT	+	+	+	+	+
Ácido cáprico	CAP	+	+	+	+	+
Ácido adípico	ADI	-	-	-	-	-
Ácido málico	MLT	+	+	+	+	+
Citrato	CIT	+	+	+	+	+
Ácido fenilacético	PAC	-	-	-	-	-
Perfil numérico		7577755	7577755	7575755	7577755	7575755

5.4.2 SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA

El 100% de las cepas de *Aeromonas caviae* presentaron sensibilidad frente a florfenicol, flumequina, gentamicina, kanamicina y sulfatrimetoprim, mostrando resistencia a oxitetraciclina (40%) (Figura 43) y ácido nalidíxico (60%). Asimismo, el 20% de las cepas evaluadas revelaron sensibilidad intermedia ante este último antibiótico. Los halos de inhibición de los antimicrobianos florfenicol y sulfatrimetoprim mostraron mayores dimensiones ante las cepas evaluadas (Tabla 42)

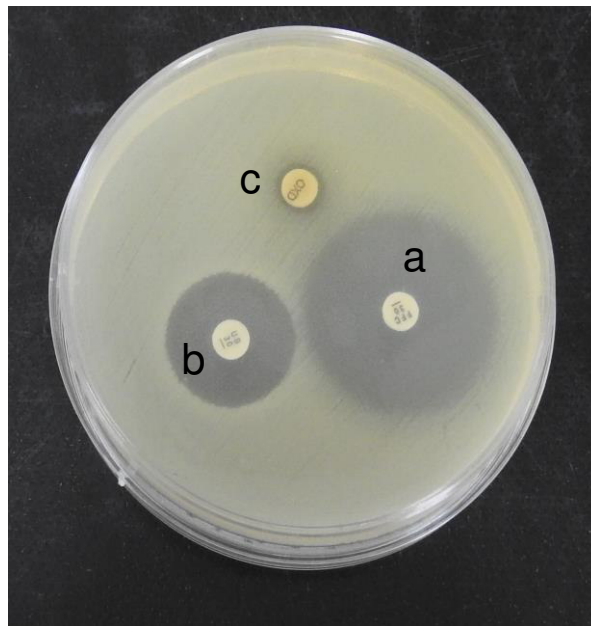


Figura 43. Placa de agar mueller hinton mostrando sensibilidad antibiótica de *A. caviae* ante florfenicol (a) y flumequina (b) y resistencia a oxitetraciclina (c).

Tabla 42. Dimensiones de los halos de inhibición (milímetros) de los discos de susceptibilidad antimicrobiana ante las cepas de *A. caviae*.

Cepas	Florfenicol (30 µg)			Flumequina (30 µg)			Gentamicina (10 µg)			Kanamicina (30 µg)			Oxitetraciclina (30 µg)			Sulfatrimetoprim (25 µg)			Ácido nalidíxico (30 µg)		
	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}	A1	A2	\bar{x}
24	42,0	41,0	41,5	36,0	35,5	35,8	24,0	23,7	23,9	26,0	26,4	26,2	46,0	45,4	45,7	38,0	37,6	37,8	26,0	25,5	25,8
25	31,0	30,5	30,8	20,5	20,0	20,3	18,5	18,0	18,3	19,0	19,8	19,4	8,0	8,5	8,3	25,5	25,0	25,3	6,0	5,4	5,7
26	38,0	37,8	37,9	23,0	22,8	22,9	18,0	17,7	17,9	21,0	20,0	20,5	14,0	13,5	13,8	23,0	22,4	22,7	6,0	6,7	6,4
27	45,0	45,5	45,3	22,0	22,4	22,2	16,0	17,5	16,8	20,0	21,7	20,9	50,0	51,0	50,5	36,0	36,8	36,4	14,0	14,5	14,3
28	36,0	37,3	36,7	21,5	20,5	21,0	21,0	20,5	20,8	21,5	20,4	21,0	22,5	21,7	22,1	23,0	22,6	22,8	6,8	6,0	6,4
Prom. Total			38,4			24,4			19,5			21,6			28,1			29,0			11,7

A1: Prueba 1; A2: Prueba 2

5.4.3 ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO

SIGNOS PATOLÓGICOS

Los signos externos frecuentemente observados fueron: petequias en vientre (3,5%), eritema en aletas pectorales (2,4%) y alrededor del ano (1,2%). Internamente se apreció congestión intestinal (3,5%) y hepática, así como gónadas hemorrágicas (2,4%) (Tabla 43).

Tabla 43. Frecuencia de manifestaciones clínicas en tilapia *Oreochromis niloticus* de la cual se aisló *Aeromonas caviae* (n = 5).

Signos	Número de peces afectados	Frecuencia (%)
Externos		
Eritema en aletas pectorales	3	3,5
Petequias en el vientre	4	4,7
Eritema alrededor del ano	1	1,2
Abultamiento en la zona anal	1	1,2
Descarga sanguinolenta a través del ano	1	1,2
Internos		
Hígado pálido	1	1,2
Hígado congestionado	2	2,4
Vesícula biliar oscura	1	1,2
Intestino congestionado	3	3,5
con líquido sanguinolento	2	2,4
Riñón posterior hemorrágico	1	1,2
Gónadas hemorrágicas	2	2,4
Ascitis sanguinolenta y mal oliente	1	1,2
Músculo esquelético con hemorragias petequiales	1	1,2

HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS

De los ejemplares analizados, cinco de ellos estuvieron afectados por el patógeno *A. caviae* y presentaron a nivel de branquias necrosis de lamelas (3,5%), congestión focal, edema severo y aneurismas focales (2,4%) (Tabla 44).

En el corazón se observó pericarditis focal (Figura 44), reacción inflamatoria focal del miocardio y edema endotelial focal a nivel de la aurícula y ventrículo (1,2%).

En tejido gástrico se encontró necrosis focal del epitelio con desprendimiento hacia la luz (3,5%) (Figura 45), reacción inflamatoria y edema focal de la lámina propia (2,4%).

En hígado se halló congestión leve de capilares sinusoides y necrosis licuefactiva focal (1,2%).

En tejido esplénico se apreció congestión difusa y edema (1,2%).

A nivel de ciegos pilóricos no se encontraron daños tisulares (5,8%). Sin embargo, en el intestino se observó necrosis de vellosidades (3,5%) y el páncreas presentó necrosis de tejido adiposo con pérdida de gránulos cimógenos (1,2%).

En riñón anterior se visualizó congestión y necrosis focal (1,2%). En riñón posterior se apreció necrosis de túbulos renales (2,4%) y hemorragias focales (1,2%).

En tejido gonadal se registró severa hemorragia (2,4%) y necrosis (1,2%).

En músculo esquelético se halló necrosis focal (1,2%).

Tabla 44. Hallazgos histopatológicos en tilapia *O. niloticus* infectada por *Aeromonas caviae* (n = 5).

Órgano	Lesión	Nº casos	Frecuencia %
Branquias	Aneurismas focales	2	2,4
	Edema severo	2	2,4
	Necrosis de lamelas	3	3,5
	Congestión focal	2	2,4
	Congestión severa	1	1,2
	Hiperplasia interlamelar focal	2	2,4
Corazón	Pericardio		
	Pericarditis	1	1,2
	Aurícula		
	Edema endotelial focal	1	1,2
	Reacción inflamatoria focal del miocardio	1	1,2
	Ventrículo		
Edema endotelial focal	2	2,4	

(Continua)

Tabla 44. (continuación)

Órgano	Lesión	Nº casos	Frecuencia %
Corazón	Reacción inflamatoria focal del miocardio	1	1,2
Estómago	Necrosis focal del epitelio con desprendimiento hacia la luz	3	3,5
	Reacción inflamatoria focal de la lámina propia	2	2,4
	Hemorragia focal en epitelio	1	1,2
	Edema focal de la lámina propia	2	2,4
	Congestión focal	1	1,2
Hígado	Necrosis licuefactiva focal	1	1,2
	Leve congestión de capilares sinusoides	1	1,2
Bazo	Congestión difusa	1	1,2
	Edema focal	1	1,2
Intestino	Necrosis de vellosidades intestinales	3	3,5
Ciegos pilóricos	Aparentemente normal	5	5,8
Páncreas	Necrosis focal de tejido adiposo	1	1,2
	Pérdida de gránulos cimógenos	1	1,2
Riñón anterior	Congestión y necrosis focal	1	1,2
Riñón posterior	Necrosis focal de túbulos renales	2	2,4
	Hemorragias focales	1	1,2
Gónada	Severa hemorragia	2	2,4
	Necrosis severa de tejido gonadal	1	1,2
Músculo esquelético	Necrosis focal	1	1,2

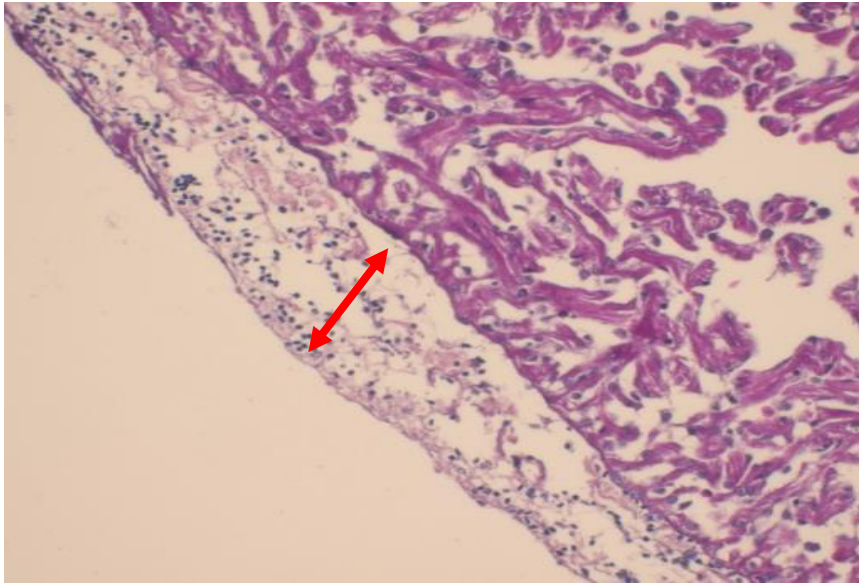


Figura 44. Pericarditis focal en el ventrículo cardíaco (flechas). Aumento: 40X.

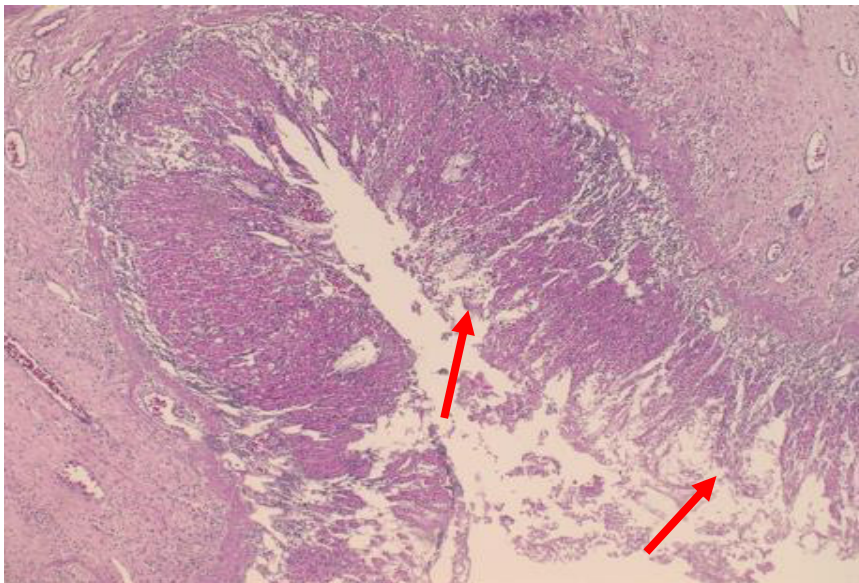


Figura 45. Observación histopatológica del estómago con necrosis focal del epitelio y desprendimiento hacia la luz (flecha). Aumento: 20X.

5.5 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS

5.5.1 Producto de amplificación de la región 16S ARNr por PCR

Se verificó la amplificación de la región 16S ARNr de las cepas evaluadas en los geles de agarosa (Figura 46, 47 y 48).

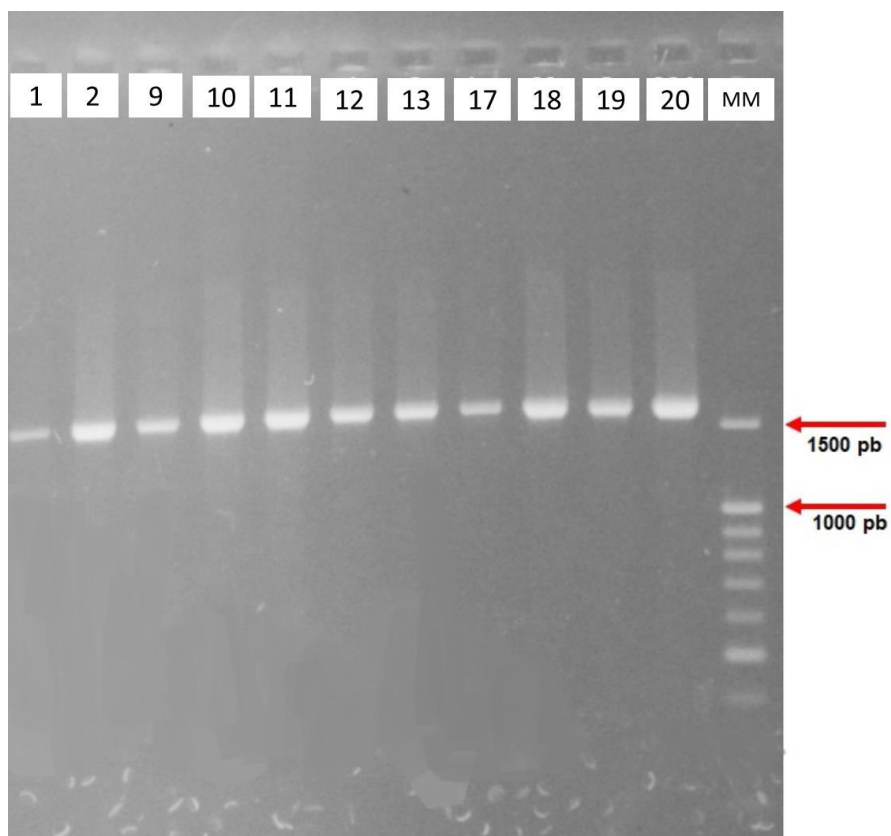


Figura 46. Amplificación de la región 16S ARNr de las cepas bacterianas de tilapia a través del método de Reacción en Cadena de la Polimerasa. La banda MM: Marcador de peso molecular; (1, 2) cepas de *E. tarda*; (9 – 13) *P. shigelloides*; (17 – 20) *S. algae*, las cuales producen amplicones de 1500 pares de bases.

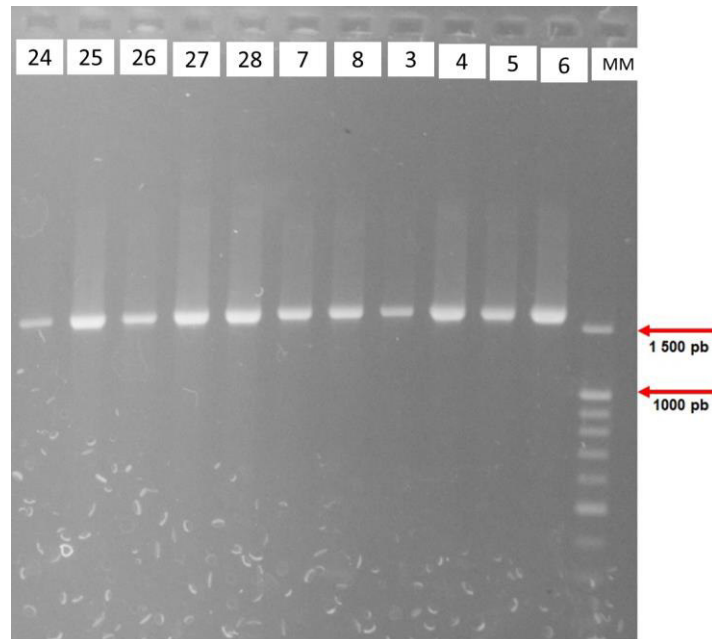


Figura 47. Amplificación de la región 16S ARNr de las cepas bacterianas de tilapia a través del método de Reacción en Cadena de la Polimerasa. La banda MM: Marcador de peso molecular; (24 - 28) cepas de *A. caviae*; (7 - 8) *C. freundii* y (3 - 6) *E. tarda*, las cuales producen amplicones de 1500 pares de bases.

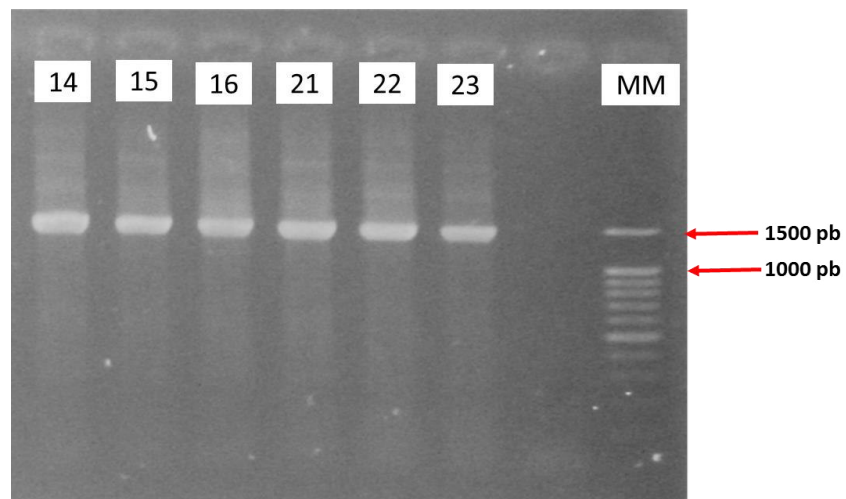


Figura 48. Amplificación de la región 16S ARNr de las cepas bacterianas de tilapia a través del método de Reacción en Cadena de la Polimerasa. La banda MM: Marcador de peso molecular; (14) cepa de *V. cholerae*, (15) *V. alginolyticus*, (16) *S. putrefaciens* y (21, 22, 23) *S. algae*, las cuales producen amplicones de 1500 pares de bases.

5.5.2 Secuencias de la región 16S ARNr de cepas bacterianas

Se efectuó la secuenciación de la región 16S ARNr de 28 cepas correspondientes a los géneros *Edwardsiella*, *Citrobacter*, *Plesiomonas*, *Vibrio*, *Aeromonas* y *Shewanella* (ver anexo). Una vez editadas las secuencias de los géneros bacterianos, se obtuvo el consenso de las mismas con identidades y cobertura de 98 a 100% a partir del BLAST (Tabla 45).

Tabla 45. Identificación molecular de bacterias patógenas aisladas de tilapias
Oreochromis niloticus.

Nombre de la Cepa	Identificación bioquímica Bacteriana	Identificación molecular Bacteriana	Cobertura	Identidad	Número de Accesoión
1	<i>E. tarda</i>	<i>E. tarda</i>	100%	100%	NR_118487.1
2	<i>E. tarda</i>	<i>E. tarda</i>	100%	99%	NR_118487.1
3	<i>E. tarda</i>	<i>E. tarda</i>	100%	99%	NR_024770.1
4	<i>E. tarda</i>	<i>E. tarda</i>	100%	99%	NR_118487.1
5	<i>E. tarda</i>	<i>E. tarda</i>	100%	99%	NR_118487.1
6	<i>E. tarda</i>	<i>E. tarda</i>	100%	98%	NR_024770.1
7	<i>C. freundii</i>	<i>C. freundii</i>	100%	98%	NR_117752.1
8	<i>C. freundii</i>	<i>C. freundii</i>	100%	99%	NR_114345.1
9	<i>P. shigelloides</i>	<i>P. shigelloides</i>	100%	100%	NR_117763.1
10	<i>P. shigelloides</i>	<i>P. shigelloides</i>	100%	100%	NR_117763.1
11	<i>P. shigelloides</i>	<i>P. shigelloides</i>	100%	99%	NR_044827.1
12	<i>P. shigelloides</i>	<i>P. shigelloides</i>	100%	99%	NR_044827.1
13	<i>P. shigelloides</i>	<i>P. shigelloides</i>	100%	99%	NR_044827.1
14	<i>V. cholerae</i>	<i>V. cholerae</i>	100%	99%	NR_044853.1
15	<i>V. algynoliticus</i>	<i>V. algynoliticus</i>	100%	98%	NR_118258.1
16	<i>S. putrefaciens</i>	<i>S. putrefaciens</i>	100%	99%	NR_044863.1
17	<i>S. algae</i>	<i>S. algae</i>	100%	99%	NR_117771.1
18	<i>S. algae</i>	<i>S. algae</i>	100%	99%	NR_117771.1
19	<i>S. algae</i>	<i>S. algae</i>	100%	99%	NR_117771.1
20	<i>S. algae</i>	<i>S. algae</i>	99%	99%	NR_117771.1
21	<i>S. algae</i>	<i>S. algae</i>	100%	99%	NR_117771.1
22	<i>S. algae</i>	<i>S. algae</i>	100%	99%	NR_117771.1
23	<i>S. algae</i>	<i>S. algae</i>	100%	99%	NR_117771.1
24	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>	100%	99%	NR_029252.1
25	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>	100%	99%	NR_104824.1
26	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>	100%	99%	NR_104824.1
27	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>	100%	99%	NR_104824.1
28	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>	100%	99%	NR_104824.1

5.5.3 Análisis de filogenia

Secuencias incorporadas en el estudio de filogenia

Al obtener las secuencias de la región 16S ARNr de las 28 cepas bacterianas correspondientes a los géneros *Edwardsiella*, *Citrobacter*, *Plesiomonas*, *Vibrio*, *Aeromonas* y *Shewanella* fueron integradas para realizar el estudio de filogenia (mostradas en tonalidad amarilla en la Tabla 46).

Dichas secuencias bacterianas fueron comparadas con la base de datos del Genbank, para lo cual se utilizó la herramienta BLAST. Posteriormente, se seleccionaron 7 secuencias derivadas del BLAST (exhibidas de color celeste en la Tabla 46).

La cepa referencial *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 obtenida del GenBank se utilizó como especie bacteriana *OUTGROUP* en el examen de filogenia, evidenciándose en tonalidad roja en la Tabla 46.

Árbol filogenético

Considerando la información del árbol filogenético basado en caracteres moleculares y evaluado mediante análisis Neighbor - Joining, cada especie bacteriana aislada se encuentra en su clado respectivo con alta similaridad teniendo como referencia las cepas ATCC evaluadas, y ubica a la especie *OUTGROUP* en el punto con mayor distancia genética con respecto a las especies aisladas (Figura 49).

Tabla 46. Secuencias 16S ARNr de especies bacterianas de los géneros *Edwardsiella*, *Citrobacter*, *Plesiomonas*, *Vibrio*, *Shewanella* y *Aeromonas* incorporadas en el estudio de filogenia.

Especie	Número de Acceso	Código de la Cepa	Año de publicación	Lugar de procedencia
<i>Edwardsiella tarda</i>	-	1	-	Perú
<i>Edwardsiella tarda</i>	-	2	-	Perú
<i>Edwardsiella tarda</i>	-	3	-	Perú
<i>Edwardsiella tarda</i>	-	4	-	Perú
<i>Edwardsiella tarda</i>	-	5	-	Perú
<i>Edwardsiella tarda</i>	-	6	-	Perú
<i>Citrobacter freundii</i>	-	7	-	Perú
<i>Citrobacter freundii</i>	-	8	-	Perú
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	-	9	-	Perú
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	-	10	-	Perú
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	-	11	-	Perú
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	-	12	-	Perú
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	-	13	-	Perú
<i>Vibrio alginolyticus</i>	-	14	-	Perú
<i>Vibrio cholerae</i>	-	15	-	Perú
<i>Shewanella putrefaciens</i>	-	16	-	Perú
<i>Shewanella algae</i>	-	17	-	Perú
<i>Shewanella algae</i>	-	18	-	Perú
<i>Shewanella algae</i>	-	19	-	Perú
<i>Shewanella algae</i>	-	20	-	Perú
<i>Shewanella algae</i>	-	21	-	Perú
<i>Shewanella algae</i>	-	22	-	Perú
<i>Shewanella algae</i>	-	23	-	Perú
<i>Aeromonas caviae</i>	-	24	-	Perú
<i>Aeromonas caviae</i>	-	25	-	Perú
<i>Aeromonas caviae</i>	-	26	-	Perú
<i>Aeromonas caviae</i>	-	27	-	Perú
<i>Aeromonas caviae</i>	-	28	-	Perú
<i>Edwardsiella tarda</i>	NR_024770.1	ATCC 15947	1996	U.S.A
<i>Citrobacter freundii</i>	NR_028894.1	ATCC 8090	1999	Alemania
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	NR_119048	ATCC 14029	1994	Francia
<i>Vibrio alginolyticus</i>	NR_118258.1	ATCC 17749	1968	Japón
<i>Vibrio cholerae</i>	NR_044853.1	CECT 514	1994	Alemania
<i>Shewanella putrefaciens</i>	NR_119141.1	ATCC 8071	1995	Francia
<i>Shewanella algae</i>	NR_117771.1	ATCC 51192	1997	Suiza
<i>Streptococcus agalactiae</i>	NR_115728.1	ATCC 13813	2006	Canadá

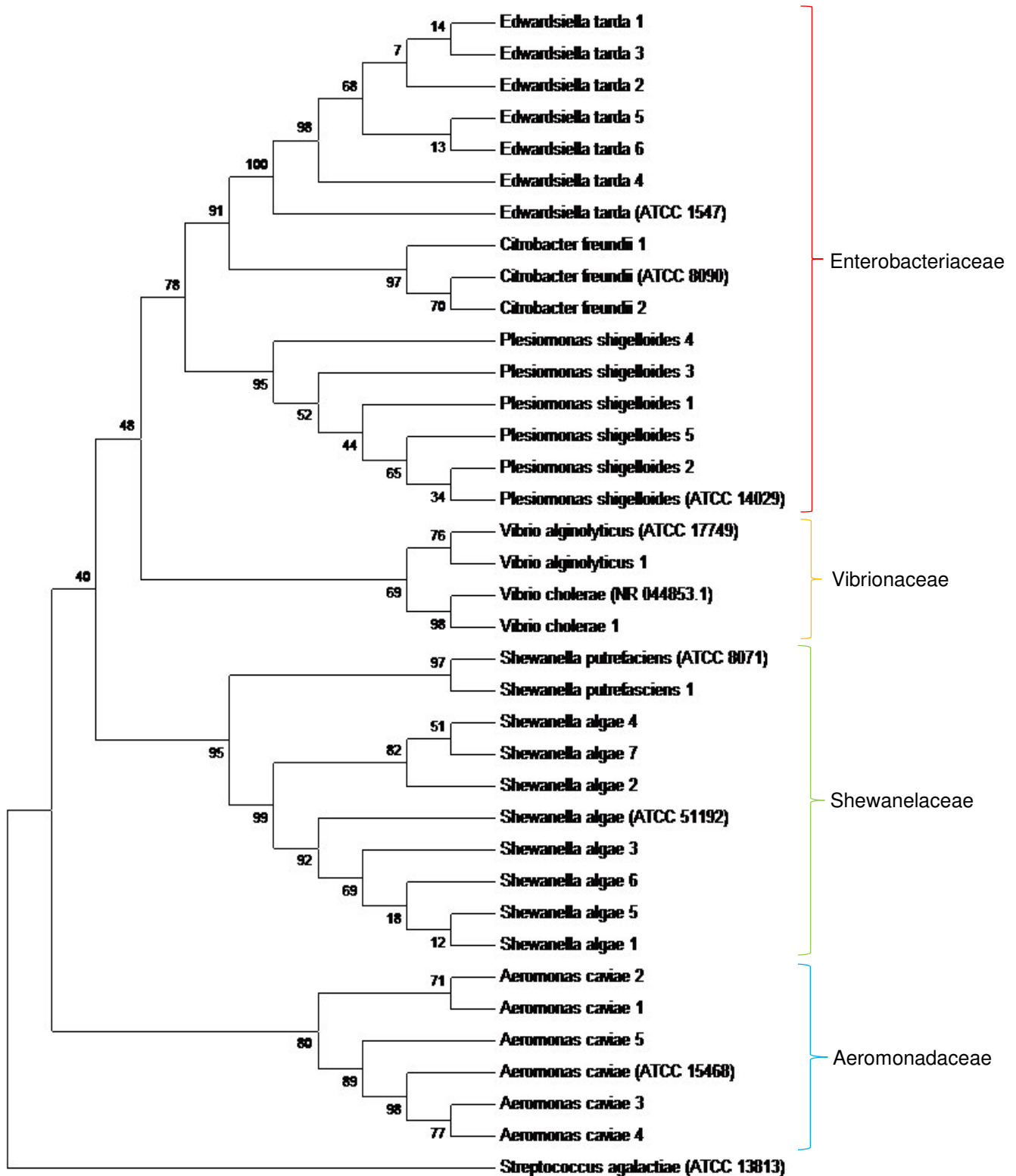


Figura 49. Árbol filogenético realizado a partir de las secuencias de ADN obtenidas de bacterias aisladas de tilapias *O. niloticus* mediante el método Neighbor - Joining con 1000 réplicas.

5.6 CARACTERÍSTICAS DE LA CALIDAD DEL AGUA DE CULTIVO

Los valores registrados de los parámetros físico – químicos del agua durante el periodo de muestreo fluctuaron en el siguiente rango para: oxígeno disuelto (3,00 – 6,6 mg/l), amoniaco no ionizado (0,00 – 0,2 mg/l), nitrito (0,00 – 2,00 mg/l), temperatura (21,1 – 32,5 °C) y pH (7,5 – 8,2) (Tabla 47).

Tabla 47. Características físico químicas del agua durante el periodo de muestreo.

Parámetros físico - químicos del agua	Valor Menor	Valor mayor	Promedio
Oxígeno disuelto (mg/l)	3,0	6,6	4,3 ± 0,78
Amoniaco no ionizado (NH ₃) (mg/l)	0,0	0,2	0,1 ± 0,10
Nitrito (mg/l)	0,0	2,0	0,7 ± 0,83
Temperatura (°C)	21,1	32,5	27,8 ± 3,02
Ph	7,5	8,2	7,8 ± 0,18

5.7 FRECUENCIA DE PECES CON SÍNTOMAS DE ENFERMEDAD

De los 85 peces examinados el 33% estuvieron infectados (Figura 50) con ocho especies bacterianas Gram negativas como *Edwardsiella tarda*, *Citrobacter freundii*, *Plesiomonas shigelloides*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Shewanella putrefaciens*, *Shewanella algae* y *Aeromonas caviae* (Tabla 48) y el 67% aparentemente sanos.

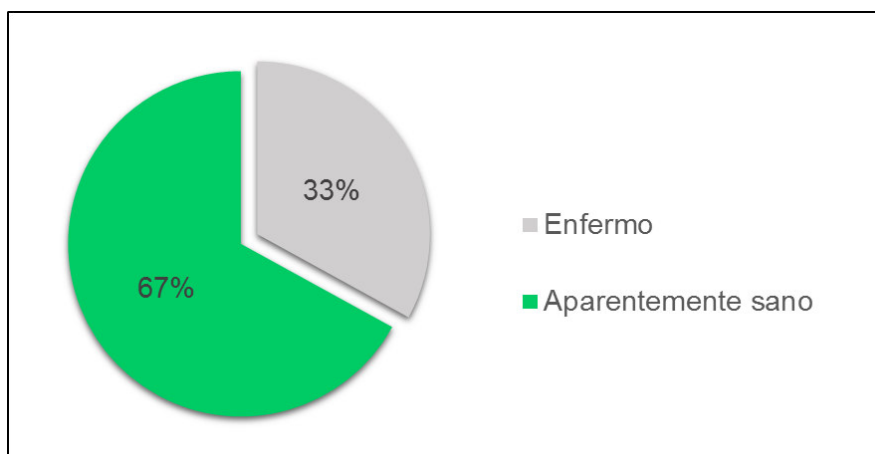


Figura 50. Frecuencia de peces con síntomas de enfermedad.

Se evidenció la mayor frecuencia de peces con síntomas de enfermedad generada por los patógenos bacterianos: *S. algae* con 8,2%, *E. tarda* (7,1%), *P. shigelloides* y *A. caviae* (5,9%).

La mayor frecuencia de peces con síntomas de enfermedad según estadio de producción se presentó en la fase comercial (57%), seguida por crecimiento (24%) (Figura 51).

Cabe señalar que las bacterias que afectaron a los peces de la fase de crecimiento fueron *E. tarda*, *C. freundii* y *P. shigelloides* con una frecuencia de 4%, respectivamente, y en la etapa comercial fueron *S. algae* (17,1%), *E. tarda* y *A. caviae* (12,2%) (Tabla 48).

Tabla 48. Frecuencia de peces con síntomas de enfermedad por patógeno bacteriano según estadio de producción en tilapia *O. niloticus*.

Estadio	nº de muestras analizadas	nº de muestras positivas	FIB %	<i>E. tarda</i>		<i>C. freundii</i>		<i>P. shigelloides</i>		<i>V. alginolyticus</i>		<i>V. cholerae</i>		<i>Sh. putrefaciens</i>		<i>Sh. algae</i>		<i>A. caviae</i>	
				nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
Alevinaje	18	0	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Crecimiento	25	6	24	1	4	1	4	1	4	0	0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	3	12
Comercial	42	22	52	5	11,9	1	2,4	4	9,5	1	2,4	1	2,4	1	2,4	7	16,7	2	4,8
TOTAL	85	28	33	6	7,1	2	2,4	5	5,9	1	1,2	1	1,2	1	1,2	7	8,2	5	5,9

FIB: Frecuencia de infección bacteriana.

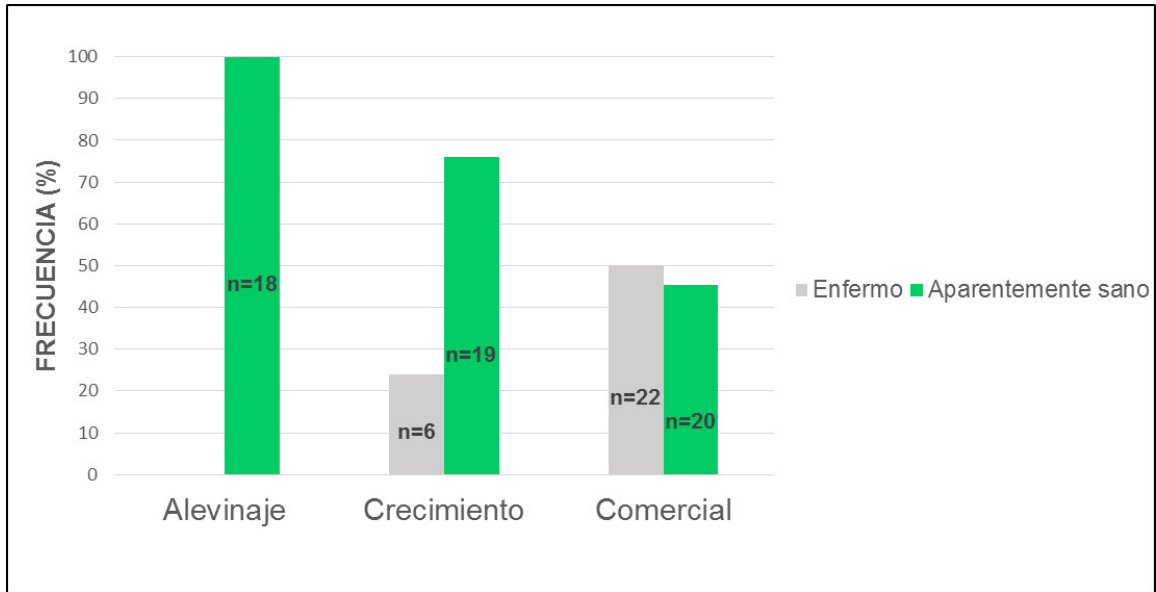


Figura 51. Frecuencia de peces con síntomas de enfermedad según estadio de producción.

La mayor frecuencia de peces con síntomas de enfermedad según la temperatura del agua se presentó cuando la misma fue mayor o igual a 30° grados centígrados (44%) (Figura 52).

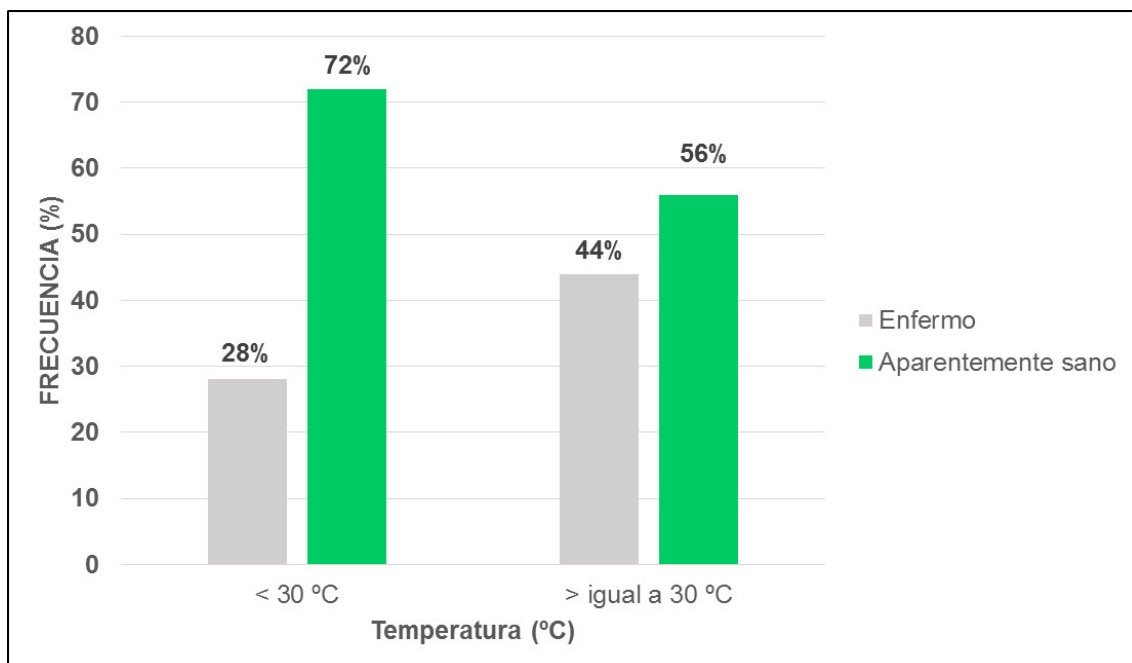


Figura 52. Frecuencia de peces con síntomas de enfermedad con respecto a la temperatura del agua.

Cabe destacar que el rango de temperatura del agua de los estanques de cultivo en donde ocurrieron brotes de enfermedad producida por *E. tarda* fluctuó entre 29,6 a 32 °C. Asimismo, se hace mención en la Tabla 49 sobre los intervalos de temperatura del agua en los que se presentaron las enfermedades bacterianas producidas por *C. freundii*, *P. shigelloides*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *S. putrefaciens*, *S. algae* y *A. caviae*.

Tabla 49. Patógenos bacterianos aislados en tilapia y rango de temperatura del agua de cultivo.

Bacteria	Rango de temperatura (°C) del agua de cultivo
<i>Edwardsiella tarda</i>	29,6 – 32
<i>Citrobacter freundii</i>	25,8 - 28,5
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	26,4 - 32,1
<i>Vibrio alginolyticus</i>	26,4
<i>Vibrio cholerae</i>	28
<i>Shewanella putrefaciens</i>	25,8
<i>Shewanella algae</i>	27,2 - 32,1
<i>Aeromonas caviae</i>	26,4 - 31,7

La mayor frecuencia de infección de peces con síntomas de enfermedad según el peso del pez se presentó cuando dicho peso fue mayor a 100 gramos (52%) (Figura 53).

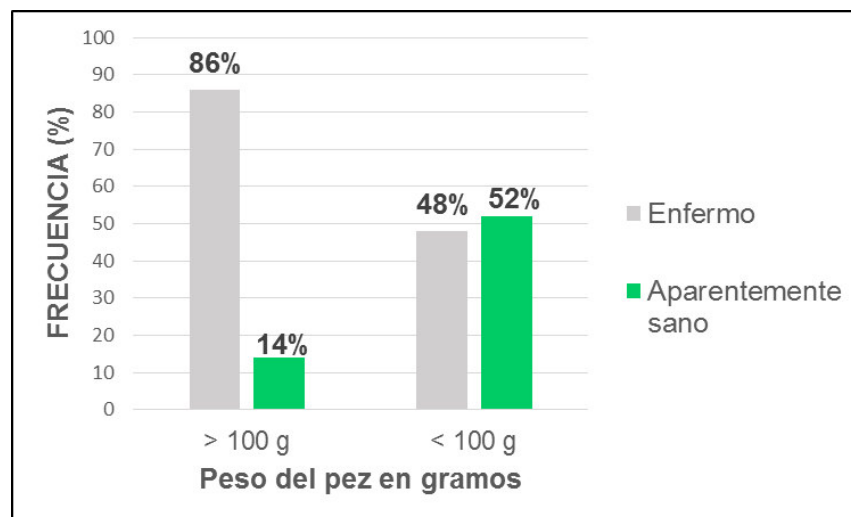


Figura 53. Frecuencia de peces con síntomas de enfermedad con respecto al peso del pez.

En la Tabla 50 se aprecia la frecuencia de peces con síntomas de enfermedad por estanque de muestreo, presentándose la mayor ocurrencia en los estanques 8, 14 y 16 con 100%.

Tabla 50. Frecuencia de peces con síntomas de enfermedad por estanque de muestreo.

Estanque	Densidad de peces	Número de muestras analizadas	Número de muestras positivas	Frecuencia de peces con síntomas de enfermedad (%)
1	39,000	24	5	20,8
2	40,000	3	0	0,0
3	10,000	4	0	0,0
4	11,000	4	1	25,0
5	21,000	9	5	55,6
8	11,633	2	2	100,0
9	10,655	3	0	0,0
11	10,470	2	1	50,0
12	11,500	6	1	16,7
13	11,762	7	3	42,9
14	10,827	7	7	100,0
16	10,500	3	3	100,0
30	43,000	5	0	0,0
31	43,967	6	0	0,0
Total		85	28	32,9

Se observó en algunos casos de enfermedades en tilapia, que el aislamiento de las cepas *Edwardsiella tarda* 2, 5 y 6 procedían de un mismo estanque en distintos periodos de tiempo. En relación a las bacterias *Plesiomonas shigelloides* 1, 2, 3 y 5 provinieron del estanque 1, las cuales fueron aisladas en noviembre del 2013 y setiembre del 2014 (Tabla 51).

Tabla 51. Aislamiento de patógenos bacterianos de tilapia *O. niloticus* por estanque y fecha de muestreo.

Fecha de Aislamiento	Bacteria	Estanque
Enero 2015	<i>Edwardsiella tarda</i> 1	5
Enero 2015	<i>Edwardsiella tarda</i> 3	14
Enero 2015	<i>Edwardsiella tarda</i> 2	13
Octubre 2015	<i>Edwardsiella tarda</i> 5	13
Marzo 2014	<i>Edwardsiella tarda</i> 6	13
Octubre 2015	<i>Edwardsiella tarda</i> 4	5
Marzo 2014	<i>Citrobacter freundii</i> 1	1
Setiembre 2014	<i>Citrobacter freundii</i> 2	12
Setiembre 2014	<i>Plesiomonas shigelloides</i> 4	14
Setiembre 2014	<i>Plesiomonas shigelloides</i> 3	1
Noviembre 2013	<i>Plesiomonas shigelloides</i> 1	1
Noviembre 2013	<i>Plesiomonas shigelloides</i> 5	1
Setiembre 2014	<i>Plesiomonas shigelloides</i> 2	1
Octubre 2015	<i>Vibrio alginolyticus</i> 1	13
Setiembre 2014	<i>Vibrio cholerae</i> 1	5
Enero 2015	<i>Shewanella putrefaciens</i> 1	5
Enero 2015	<i>Shewanella algae</i> 4	8
Octubre 2015	<i>Shewanella algae</i> 7	5
Setiembre 2014	<i>Shewanella algae</i> 2	16
Enero 2015	<i>Shewanella algae</i> 3	8
Enero 2015	<i>Shewanella algae</i> 6	14
Enero 2015	<i>Shewanella algae</i> 5	14
Setiembre 2014	<i>Shewanella algae</i> 1	14
Setiembre 2014	<i>Aeromonas caviae</i> 2	11
Setiembre 2014	<i>Aeromonas caviae</i> 1	14
Setiembre 2014	<i>Aeromonas caviae</i> 5	16
Setiembre 2014	<i>Aeromonas caviae</i> 3	16
Setiembre 2014	<i>Aeromonas caviae</i> 4	14

5.7.1 FACTORES ASOCIADOS A LA PRESENCIA DE PECES SINTOMÁTICOS

Se observó que para todas las variables cualitativas de peso del pez, estadio de producción y temperatura del agua se rechaza la hipótesis de independencia ($p < 0,05$) conforme con la prueba de chi cuadrado de independencia, por lo tanto, la presencia de peces sintomáticos con infección bacteriana tiene asociación con el peso del pez ($p < 0,001$) y a su vez con el estadio de producción ($p < 0,001$). Asimismo, los animales positivos a enfermedades bacterianas presentaron asociación con la temperatura del agua ($p = 0,036$) (Tabla 52).

Tabla 52. Prueba de independencia de las variables analizadas.

Variables	Chi cuadrado	p valor
Peso del pez	14,203	<0,001
Estadio de producción	16,932	<0,001
Temperatura del agua	4,406	0,036

ESTADO DE INFECCIÓN Y PESO DE LOS PECES

Los pesos de los peces no presentaron una distribución normal de acuerdo con el test de Kolmogorov – Smirnov para peces enfermos y aparentemente sanos ($p < 0,001$), en consecuencia, se utilizó la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney de comparación de medias. Mediante esta prueba se concluyó ($p < 0,001$) que existen diferencias entre los promedios de los pesos de peces aparentemente sanos y enfermos, con ayuda del gráfico de cajas se observa que el promedio de los pesos en aquellos animales que se encontraban enfermos es mayor (383,82 g.) en comparación con el promedio de los pesos de los peces aparentemente sanos (Figura 54) (Tabla 53).

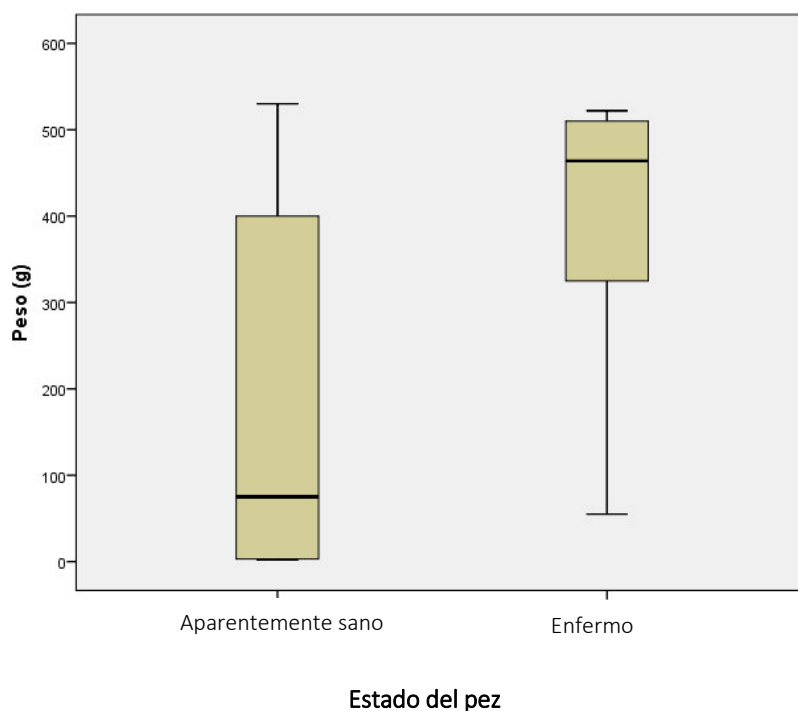


Figura 54. Diferencia entre las medias de los pesos según el estado del pez.

Tabla 53. Estado de infección en relación al peso del pez.

Estado de infección bacteriana	n° de muestras	Peso (g.)
Negativo	57	177.25 ± 200.84
Positivo	28	383.82 ± 177.51

Nivel de significancia de acuerdo con el test U de Mann-Whitney, $p < 0,001$.

ESTADO DE INFECCIÓN DE LOS PECES Y TEMPERATURA DEL AGUA

La temperatura del agua no presenta una distribución normal, así se demostró usando el test de Kolmogorov – Smirnov para peces enfermos y aparentemente sanos ($p < 0,001$), de modo que se empleó el test no paramétrico de U de Mann-Whitney de comparación de medias. Mediante esta prueba se concluyó ($p = 0.036$) que existen diferencias entre los promedios de la temperatura del agua de peces aparentemente sanos y enfermos, con ayuda del grafico de cajas se observa que

el promedio de la temperatura del agua en aquellos animales que se encontraban enfermos por patógenos bacterianos es mayor ($29.11\text{ }^{\circ}\text{C}$) en comparación con el promedio de la temperatura del agua de los peces aparentemente sanos. (Tabla 54) (Figura 55).

Tabla 54. Estado de infección de peces con respecto a la temperatura del agua.

Estado de infección	número de muestras	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
Aparentemente sano	57	$27,93 \pm 2,07$
Enfermo	28	$29,11 \pm 2,22$

Nivel de significancia de acuerdo con el test U de Mann-Whitney, $p=0,036$.

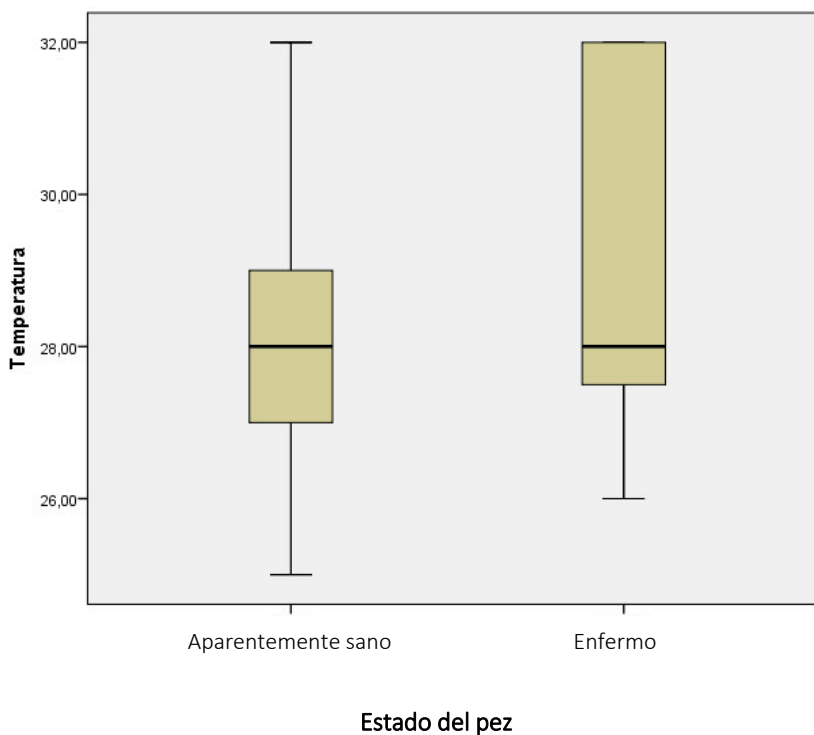


Figura 55. Diferencia entre las medias de las temperaturas del agua según el estado del pez.

5.8 MANEJO SANITARIO DE LA PISCIGRANJA

En el recinto del centro de producción se apreció que en la puerta de entrada los vehículos pasaban por un rodaluvio, los cuales eran desinfectados por un operario mediante el uso de una bomba de mochila.

En cuanto a las principales rutas de transmisión de patógenos se apreció el siguiente manejo sanitario en la:

Sala de alevinaje

En la entrada de la sala contaban con alcohol gel para manos y pediluvio que contenía cal viva (Tabla 55) (Figura 56).

Animales: Los peces moribundos o muertos se retiran inmediatamente durante el día.

Desechos: La disposición final de los productos de desecho (peces moribundos o muertos) era destinada para compostaje.

Equipos: Utilizaban redes e implementos que eran compartidos en todos los tanques y al final de la jornada de trabajo efectuaban la limpieza y secado de los mismos, exponiéndolos a la luz solar.

Agua: Utilizaban como afluente agua de pozo con aireación constante. Una vez cosechado los peces el efluente era usado en el riego de las áreas verdes del centro de cultivo.

Alimento: Los peces consumían alimento balanceado.

Personal: Los trabajadores y visitantes usaban indumentaria (ropa y botas) proporcionada por la empresa para la jornada de trabajo.

Tabla 55. Principales rutas de transmisión de patógenos y manejo sanitario en la sala de alevinaje.

Rutas de transmisión de patógenos	Manejo sanitario
Entrada de la sala	
Pediluvio	Presencia con cal viva
Envase con alcohol gel	Presencia
Animales	
Peces muertos	Retiro inmediato durante el día
Peces moribundos	Retiro inmediato durante el día
Aves	Ausencia
Productos de desecho	
Disposición final	Para compostaje
Equipos	
Red	Uso compartido en todas los tanques de la unidad Limpieza y secado al sol
Agua	
Afluente	Proveniente de pozo
Efluente	Riego de áreas verdes
Alimento	
Balanceado	Raciones diarias (8 a 10 veces)
Personal	
Trabajadores	Uso de ropa de trabajo y botas
Visitantes	Uso de guardapolvo y botas

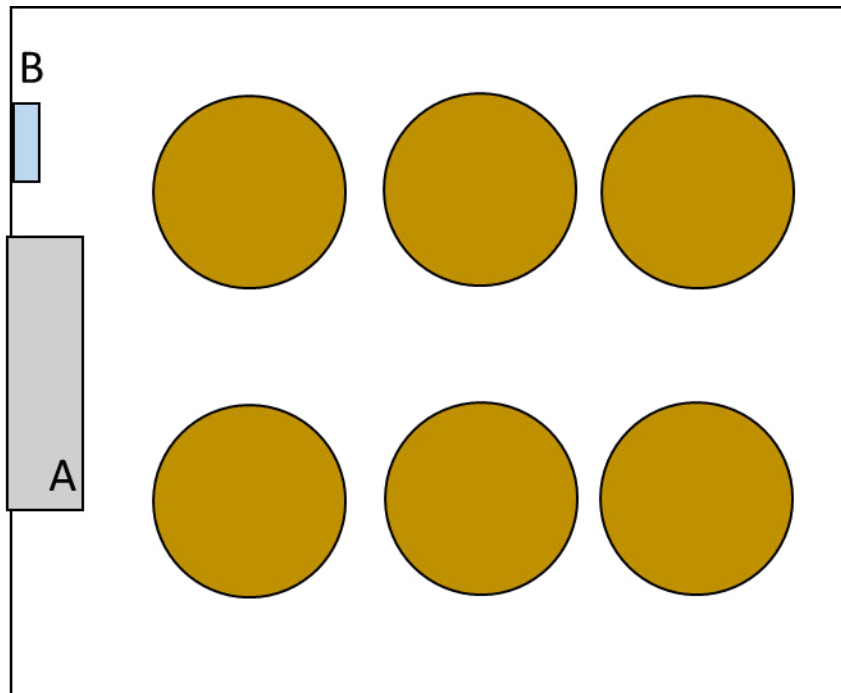


Figura 56. Esquema de los tanques circulares en sala de alevinaje. A. Pediluvio con cal y B. Envase con alcohol gel.

Salas de crecimiento y comercial

En la entrada de ambas salas no contaban con maniluvio ni pediluvio (Tabla 56) (Figura 57).

Animales: En cuanto a la remoción diaria e inmediata de los peces moribundos o muertos, se observó que los ejemplares permanecían en los estanques. No se apreciaron aves predadoras en el cultivo debido a que existían barreras físicas como la presencia de las pozas de cultivo dentro de un invernadero.

Desechos: La disposición final de los productos de desecho (peces moribundos o muertos) fue destinada para compostaje.

Equipos: Utilizaban redes e implementos que eran compartidos en todas las pozas y al final de la jornada se efectuaba la limpieza y secado de los mismos, exponiéndolos a la luz solar.

Agua: Empleaban como afluente agua de pozo con aireación constante. Una vez concluido el cultivo, el efluente generado era usado en el riego de las áreas verdes del centro de cultivo.

Alimento: Los peces consumían alimento balanceado.

Personal: Los trabajadores y visitantes utilizaban indumentaria (ropa y botas) proporcionada por la empresa para las labores en el centro de cultivo.

Tabla 56. Principales rutas de transmisión de patógenos y manejo sanitario en la sala de crecimiento y comercial.

Rutas de transmisión de patógenos	Manejo
Entrada de la sala	
Pediluvio	Ausencia
Maniluvio	Ausencia
Animales	
Peces muertos	Permanencia en estanque
Peces moribundos	Permanencia en estanque
Aves	Sin acceso
Productos de desecho	
Disposición final	Para compostaje
Equipos	
Red	Uso compartido en todas las pozas de la unidad Limpieza y secado al sol
Agua	
Afluente	Proveniente de pozo
Efluente	Riego de áreas verdes
Alimento	
Balanceado	Raciones diarias (8 a 10 veces)
Personal	
Trabajadores	Uso de ropa de trabajo y botas
Visitantes	Uso de guardapolvo y botas

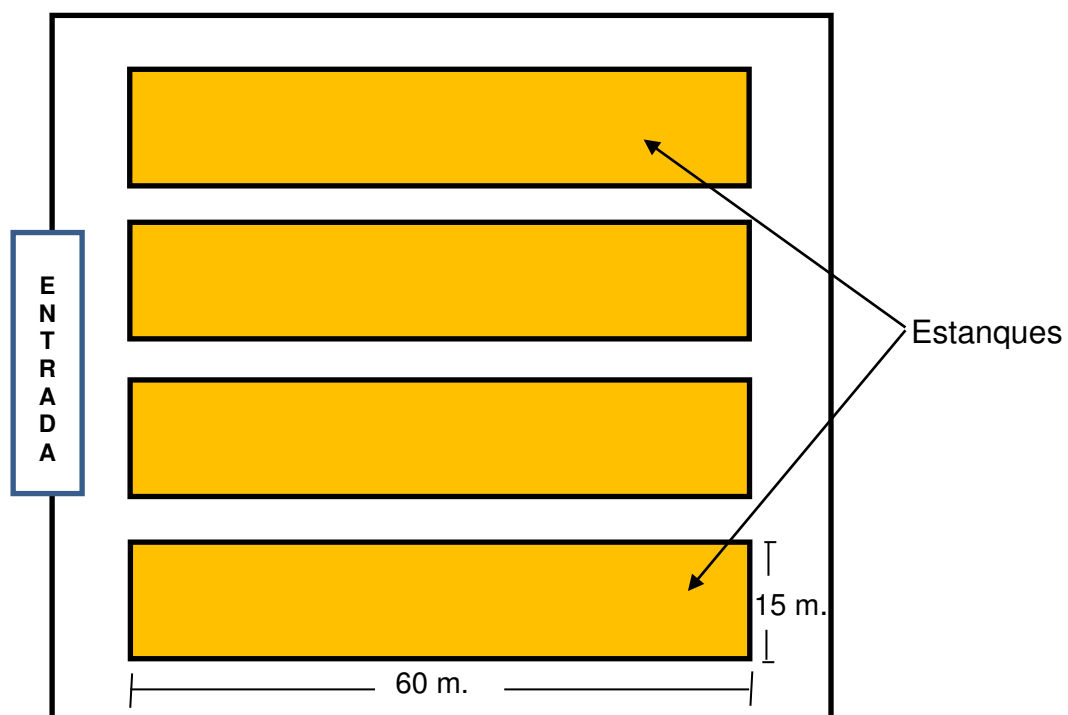


Figura 57. Esquema de los estanques de la sala de crecimiento de tilapia *O. niloticus*.

VI. DISCUSIÓN

6.1 Bacterias aisladas de peces sintomáticos

6.1.1 *Edwardsiella tarda*

Con respecto a la caracterización bioquímica de las cepas bacterianas mediante el uso de pruebas convencionales expuestas en la Tabla 2, éstas revelaron que todos los aislados fueron bioquímicamente homogéneos a excepción de la prueba de inositol. La totalidad de las cepas presentaron metabolismo fermentativo frente a glucosa, produjeron indol e hidrógeno sulfurado. Asimismo, fueron negativas ante las pruebas de citrato, lactosa, sorbitol y Voges Proskauer, coincidiendo con diversos autores (Najiah *et al.*, 2006; El-Seedy *et al.*, 2015). En relación a la prueba de manitol, esta fue positiva a la producción de ácido en la totalidad de cepas analizadas y presentó variaciones frente a la prueba de inositol, concordando con lo reportado por Park *et al.* (2012) y Habtame & Kebede (2016), quienes describieron variabilidad ante dichas pruebas.

La caracterización bioquímica de aislados bacterianos de *E. tarda* mediante el sistema miniaturizado API 20 E obtuvo baja discriminación (34,6%) en cuatro cepas, siendo identificadas como *Edwardsiella hoshinae*. Sin embargo, hubieron pruebas en contra para su confirmación dentro de esta especie, tal como la reacción ante sacarosa y arabinosa, lo cual nos indicaría que dichas bacterias corresponden a *E. tarda*, coincidiendo con lo reportado por Grimont *et al.* (1980), quienes realizaron la determinación mediante pruebas convencionales. Por otro lado, se identificaron dos cepas como *E. tarda* utilizando dicho sistema, lo cual concuerda con lo descrito por El Deen Aie *et al.* (2017). Cabe mencionar que se obtuvo reacción negativa ante la prueba de citrato, siendo una característica homogénea, lo cual difiere con El-Seedy *et al.* (2015), cuyas cepas exhibieron variabilidad. Asimismo, en las pruebas de oxidación de manitol y arabinosa resultaron positivas no guardando semejanza con el autor antes referido.

En cuanto a la susceptibilidad antibiótica del patógeno, mostró sensibilidad a florfenicol, flumequina, sulfatrimetoprim, oxitetraciclina, kanamicina y ácido nalidíxico, guardando semejanza con lo reportado por diversos autores (Mohanty & Sahoo, 2007; Castro, 2011; Lee, 2011; Nadirah *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2014; El Deen Aie *et al.*, 2017). Cabe destacar que la sensibilidad de las cepas frente a la totalidad de los antibióticos evaluados, probablemente se deba a que en la piscigranja no se utilizan antimicrobianos para tratar enfermedades por lo cual dichos patógenos no han adquirido resistencia antibiótica, ya que existen reportes que el uso excesivo e irresponsable de agentes antimicrobianos puede potencialmente provocar el desarrollo de resistencia a tales agentes en patógenos de peces (Lee *et al.*, 2011; Nadirah *et al.*, 2012).

Cabe señalar que la identificación de *E. tarda* fue confirmada por la región 16S ARNr y guarda similitud con lo reportado por Joh *et al.* (2011) quienes describieron que la secuencia parcial del gen 16S ARNr fue idéntica a las cepas de *E. tarda* aisladas de anguila (*Anguilla japonica*) y mostró 98 a 100% de identidad comparadas con las secuencias del Genbank. Asimismo, concuerda con lo hallado por Nantongo (2017) quien reportó cepas bacterianas de *E. tarda* aisladas de tilapia y bagre africano con una identidad de 99.9% con respecto a las secuencias del Genbank (KX388234.1, FJ607400.1, FJ600537.1, KU860461.1, HQ663902.1, JX866952.1, KX828266.1)

Desde el punto de vista anatomopatológico, el signo externo observado fue exoftalmia, lo cual coincide con Miyazaki & Kaige (1985) y El Deen Aie *et al.* (2017), así como eritema en las aletas y la presencia del ano enrojecido, concordando con diversos autores (Mohanty & Sahoo, 2007; El Deen Aie *et al.*, 2017).

Entre los signos internos frecuentemente observados en los ejemplares estudiados, se presentó líquido ascítico en la cavidad visceral, lo cual concuerda con lo reportado por El-Yazeed & Ibrahim (2009) y El-Seedy *et al.*, (2015). Dicho signo se atribuye a la excreción bacteriana de la toxina extracelular hemolisina (El Deen Aie *et al.*, 2017). Asimismo, se visualizaron nodulaciones blanquecinas en el hígado, coincidiendo con lo encontrado por Miyazaki & Kaige (1985) y El-Yazeed

& Ibrahim (2009). También se observó congestión en dicho órgano (El-Seedy *et al.*, 2015; El Deen Aie *et al.*, 2017) e inflamación en el intestino guardando semejanza con lo descrito por El-Yazeed & Ibrahim (2009).

Con respecto a los hallazgos histopatológicos por *E. tarda* en tilapias, se apreció en las lamelas branquiales la presencia de necrosis de tipo focal e hiperplasia de células epiteliales, lo cual coincide con diversos autores (Mohanty & Sahoo, 2007; El Deen Aie *et al.*, 2017).

La lesión apreciada en tejido cardiaco fue pericarditis, guardando semejanza con lo reportado por Pirarat (2007).

A nivel del hígado se observó degeneración hidrópica, lo cual coincide con lo descrito por El Deen Aie *et al.* (2017). Asimismo, se apreció necrosis focal de hepatocitos y congestión de capilares sinusoides, siendo concordante a lo hallado por Thangalapam *et al.* (2015) en bagre africano.

En el bazo se visualizó necrosis focal de esplenocitos y congestión, lo cual coincide con varios autores (Mohanty & Sahoo, 2007; El Deen Aie *et al.*, 2017).

A nivel del riñón posterior se observó necrosis, la cual guarda semejanza con lo descrito por El Deen Aie *et al.* (2017) y Miyazaki & Kaige (1985).

Cabe destacar que Zhou *et al.* (2014) reportó necrosis intestinal y de músculo esquelético en pez marinka prenatova (*Schizothorax prenanti*), coincidiendo con lo observado en la presente investigación.

En los folículos gonadales se encontró severa necrosis, lo cual guarda similitud con lo encontrado por Mohanty & Sahoo (2007) en bagre asiático (*Clarias batrachus*).

En cuanto a la respuesta de tipo granulomatosa encontrada en hígado, bazo y riñón, concuerda con lo observado en tilapia (*Tilapia nilotica*) (Miyazaki & Kaige, 1985) y anguila (*Anguilla japonica*) (Park *et al.*, 2012).

6.1.2 *Citrobacter freundii*

De acuerdo a la caracterización bioquímica de las cepas bacterianas mediante pruebas convencionales concuerda con lo reportado por varios autores (Benites de Padua *et al.*, 2014; Cao *et al.*, 2016; El-Barbary & Hal, 2017), ya que produjeron hidrógeno sulfurado y metabolizaron carbohidratos como glucosa, manitol y sorbitol. Asimismo, las cepas fueron negativas a las pruebas de Voges Proskauer e indol. Cabe destacar que la prueba de inositol resultó positiva. Sin embargo, utilizando el sistema API 20 E resultó negativa concordando con lo descrito por los autores antes mencionados.

Con respecto a las características bioquímicas reportadas por Benites de Padua *et al.* (2014) y Svetlana *et al.* (2003), quienes utilizaron dicho sistema, se encontró que algunas pruebas difirieron con lo observado en este estudio, tales como la producción de arginina dehidrolasa y ácido a partir de amigdalina. De igual forma, se revelaron diferencias en otras pruebas que mostraron negatividad ante betagalactosidasa y citrato conforme a lo señalado por Cao *et al.* (2016) y Svetlana *et al.* (2003).

De acuerdo a estudios efectuados por Toranzo *et al.* (1994) y Cao *et al.* (2016), las bacterias presentaron sensibilidad antibiótica ante gentamicina y resistencia a oxitetraciclina y sulfatrimetoprim, resultando análogo con lo encontrado en el presente estudio. Asimismo, se observó sensibilidad a kanamicina, lo cual difiere con lo reportado por Toranzo *et al.* (1994).

Además, la identificación de *C. freundii* fue corroborada por la secuenciación de la región 16S ARNr y concuerda con lo referido por El-Barbary & Hal (2017) quienes mencionan que la secuencia parcial del gen 16S ARNr fue idéntica a la cepa *C. freundii* (número de acceso KY404157) y reveló 99% de identidad a *C. freundii* (KX156769) aislada de agua de estanques de acuicultura.

Desde el enfoque patológico, se evidenciaron signos externos como eritema en piel y orificio anal con descarga de fluido sanguinolento, guardando semejanza

con lo registrado por Svetlana *et al.* (2003) y Thanigaivel *et al.* (2015) en trucha, carpa y tilapia.

Con respecto a los signos internos se visualizó el hígado y gónadas hemorrágicas, guardando similitud con lo encontrado por Svetlana *et al.* (2003).

En cuanto a los hallazgos histopatológicos, se observó edema focal en el epitelio de la lamela secundaria, lo cual coincide con El-Barbary & Hal (2017).

A nivel cardiaco se apreciaron focos inflamatorios en la aurícula y ventrículo, concordando con lo registrado por Benites de Padua *et al.* (2014) en bagre.

En hígado se evidenció degeneración grasa y congestión focal de capilares sinusoides, resultando semejante a lo hallado por diversos autores (Svetlana *et al.*, 2003; Benites de Padua *et al.*, 2014; El-Barbary & Hal, 2017), quienes reportaron dichas lesiones en tilapia (*O. niloticus*), bagre brasileño nativo (*Pseudoplatystoma*) y trucha arco iris (*O. mykiss*).

En intestino se observó reacción inflamatoria en la lámina propia, lo cual guarda semejanza con Svetlana *et al.* (2003).

6.1.3 *Plesiomonas shigelloides*

Las cepas bacterianas de esta especie presentaron metabolismo fermentativo de glucosa y fueron positivas a las pruebas de indol y rojo de metilo, siendo negativas a la producción de hidrógeno sulfurado, citrato, Voges Proskauer y manitol, guardando analogía con lo referido por diversos autores (Klein *et al.*, 1993; Inglis *et al.*, 2001; Gonzales - Rey, 2003). Por otro lado, algunos aislados bacterianos exhibieron variabilidad ante las pruebas de sorbitol e inositol, no guardando semejanza con los autores anteriormente citados.

La caracterización bioquímica de las cepas bacterianas mediante el sistema miniaturizado API 20 NE mostraron homogeneidad entre las mismas y obtuvieron excelente nivel de identificación (99,9%), lo cual concuerda con lo reportado por

Klein *et al.* (1993). Cabe señalar que estudios efectuados por Claesson *et al.*, (1984) encontraron reacciones negativas ante la prueba de asimilación de maltosa y positividad a ácido cáprico, lo cual difiere con lo descrito en el presente trabajo.

Investigaciones realizadas por Cruz *et al.* (1986), Jagger (2000) y Woo *et al.* (2011) indicaron que las cepas bacterianas mostraron sensibilidad a gentamicina y flumequina, coincidiendo con lo hallado en el presente estudio. Asimismo, se tiene referencia de investigaciones efectuadas por Bravo *et al.* (2009) y Nadirah *et al.* (2012), quienes señalan la resistencia de las cepas frente a tetraciclina, concordando con lo hallado en esta investigación.

Cabe destacar que los aislados mostraron sensibilidad a sulfatrimetoprim, lo cual difiere con lo descrito por Woo *et al.* (2011).

El 60% de las cepas aisladas presentaron resistencia a ácido nalidíxico, lo cual difiere con lo descrito por Cruz *et al.* (1986) y Jagger (2000), quienes manifestaron sensibilidad ante dicho compuesto.

La identificación de *P. shigelloides* mediante la caracterización bioquímica fue corroborada por la secuenciación de la región 16S ARNr y guarda semejanza con lo informado por Nisha *et al.* (2014), quienes afirmaron que la secuencia parcial del gen 16S ARNr fue similar a la cepa de *P. shigelloides* (número de accesión KF769536) y reveló 99% de identidad a dicha especie (NR_044827.1) que se encuentra en el Genbank.

En cuanto a los signos externos más frecuentemente observados se presentaron aletas pectorales eritematosas, ano abultado y enrojecido con descarga de fluido amarillento, coincidiendo con lo reportado por y Jagger (2000), Woo *et al.* (2011) y Öztürk & Altınok (2014), quienes describieron dichos signos en pez lengüihueso malayo (*S. formosus*) y guppies (*P. reticulata*).

Con respecto a los signos internos se apreció enteritis catarral y ascitis en la cavidad visceral, guardando similitud con lo registrado por Nadirah *et al.* (2012) y Liu *et al.* (2015).

Las lesiones tisulares encontradas en el presente estudio, constituyen el primer reporte en tilapia, apreciándose la lámina propia edematosa y necrosis epitelial de la mucosa gástrica e intestinal. Asimismo, se observó necrosis de gónada y de tejido hematopoyético del riñón anterior. Cabe destacar que los hallazgos anteriormente mencionados no han sido descritos por Cruz *et al.* (1986) en trucha.

De acuerdo a los hallazgos histopatológicos, se observó en una muestra nefrocalcinosis focal, la cual no se encuentra asociada con enfermedades de tipo bacteriana, según lo descrito por Bruno (1996), quien refiere diversas etiologías para dicha lesión como exposición prolongada de los peces a niveles elevados de dióxido de carbono, deficiencia de magnesio o toxicidad de selenio en la dieta.

6.1.4 *Vibrio alginolyticus*

En relación a la caracterización bioquímica de la cepa aislada usando pruebas convencionales, presentó metabolismo fermentativo, así como positividad ante las pruebas de citrato, manitol, sacarosa, descarboxilación de lisina y producción de indol, lo cual concuerda con reportado por Rajan *et al.* (2001), Zorrilla *et al.* (2003) y Liu *et al.* (2004). Por otro lado, se ha descrito reacción negativa ante la producción de hidrógeno sulfurado y arginina dehidrolasa, coincidiendo con distintos autores (Zorrilla *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; Younes *et al.*, 2016).

En el caso de la prueba de Voges Proskauer resultó negativa, concordando con Rajan *et al.* (2001) y Sonia & Lipton (2012).

En cuanto a la tolerancia de la bacteria al crecimiento en cloruro de sodio se desarrolló a concentraciones de 1 y 3% de sal, debido a que los ejemplares muestreados fueron cultivados en un ambiente salobre, guardando analogía con lo informado por Younes *et al.* (2016). Cabe destacar que la bacteria en mención

es halófila y puede crecer a mayores concentraciones de sal, conforme a lo referido por Liu *et al.* (2004) y Krupesha sharma *et al.* (2013).

En estudios realizados por Sonia & Lipton (2012) y Younes *et al.* (2016), describieron sensibilidad bacteriana ante el agente vibriostático (O/129), lo cual concuerda con lo apreciado en el presente trabajo.

Con respecto a la identificación de *V. alginolyticus* mediante el sistema miniaturizado API 20 NE se observó muy buen nivel de identificación, guardando semejanza con lo referido por Younes *et al.* (2016). Sin embargo, reveló una diferencia con respecto a la prueba de asimilación de ácido malico, la cual fue positiva según lo mencionado por Younes *et al.* (2016) y Abdalah *et al.* (2009). Cabe señalar que existe discordancia entre la prueba de citrato de este sistema con respecto a la reacción bioquímica convencional.

En relación a la susceptibilidad ante diversos antimicrobianos, la cepa evaluada presentó sensibilidad a ácido nalidíxico, oxitetracilina, flumequina, gentamicina, kanamicina y sulfatrimetoprim, coincidiendo con lo descrito por Younes *et al.* (2016), Liu *et al.* (2004), Zorrilla *et al.* (2003), Sonia & Lipton (2012), Rajan *et al.* (2001) y Oh *et al.* (2011).

La identificación de *V. alginolyticus* fue ratificada por la secuenciación de la región 16S ARNr y guarda semejanza con lo registrado por Krupesha Sharma *et al.* (2013), quienes encontraron que la secuencia parcial del gen 16S ARNr fue parecida a la cepa *V. algynoliticus* (número de accesoión JF260912) y mostró 100% de identidad a *V. algynoliticus* (EU155523) aislada de jurel deteriorado.

En cuanto a los signos internos se apreció congestión hepática, lo cual coincide con lo reportado por Balebona *et al.* (1998) en seabream.

De acuerdo a los hallazgos histopatológicos se encontró congestión en las lamelas secundarias, congestión y necrosis de hepatocitos, guardando similitud con lo descrito por Krupesha sharma *et al.* (2013) en barramundi (*Lates calcifer*).

Sin embargo, otros autores no observaron lesiones en corazón, intestino y riñón posterior como lo apreciado en la presente investigación.

6.1.5 *Vibrio cholerae*

Las características bioquímicas de la cepa aislada mediante pruebas convencionales, mostraron metabolismo fermentativo de glucosa, así como positividad ante las pruebas de indol, citrato, rojo de metilo, Voges Proskauer y descarboxilación de lisina. Produjeron ácido a partir de glucosa, manitol y sacarosa. Cabe destacar que dicha bacteria fue ratificada como negativa a la producción de hidrógeno sulfurado, arginina dehidrolasa, lactosa e inositol, lo cual coincide con lo reportado por diversos autores (Kiiyukia *et al.*, 1992; Austin & Austin, 2007; Rehulka *et al.*, 2015).

La prueba de sorbitol difiere con lo descrito por Austin & Austin (2007), quienes afirman que esta bacteria no metaboliza dicho carbohidrato.

En cuanto a la tolerancia de crecimiento bacteriano en cloruro de sodio, dicha cepa se desarrolló a concentraciones de 0 a 3% de sal, guardando semejanza con lo descrito por Kiiyukia *et al.* (1992) e Inglis *et al.* (2001). Asimismo, el aislado presentó sensibilidad ante el agente vibriostático (O/129), lo cual concuerda con lo reportado por Muroga *et al.* (1979), Inglis *et al.* (2001) y Rehulka *et al.* (2015).

Con respecto a la caracterización bioquímica de *V. cholerae* mediante el sistema API 20 NE, se obtuvo muy buena identificación, coincidiendo con lo señalado por Zarate *et al.* (2011). Cabe señalar que el mencionado sistema ha sido utilizado para la identificación de dicha especie por Deris *et al.* (2009) y Zmeter *et al.* (2018).

En cuanto a la sensibilidad antibiótica de *V. cholerae* ante ácido nalidíxico y oxitetraciclina fue similar a lo descrito por Kiiyukia *et al.* (1992). Por otro lado, Kiiyukia *et al.* (1992) y Zhang *et al.* (2012) reportaron resistencia parcial a kanamicina y sulfatrimetoprim, no concordando con lo observado en la presente investigación donde se reveló sensibilidad para dichos antibióticos.

Estudios realizados por Zhang *et al.* (2012) corroboran la identificación de *V. cholerae* (número de accesoión JF939043) mediante la secuenciación de la región 16S ARNr, revelando una identidad de 99% con las secuencias comparadas en el Genbank, lo cual guarda semejanza con la confirmación molecular de dicha especie en el presente estudio.

En relación a los signos externos se observó eritema en vientre, lo cual guarda semejanza con lo registrado por Rehulka *et al.* (2015) en condrostoma común (*C. nasus*) y cacho (*S. cephalus*). Con respecto a los signos internos se apreció congestión de hígado e intestino, guardando similitud con lo descrito por Austin & Austin (2007) en ayu (*P. altivelis*).

Desde el punto de vista histopatológico se observó severa reacción inflamatoria en tejido cardíaco, edema focal en estómago e intestino, así como necrosis en hígado, páncreas, riñón anterior y posterior, constituyendo dichas lesiones el primer reporte en tejidos producidas por la bacteria en mención.

6.1.6 *Shewanella putrefaciens*

Las características bioquímicas de esta especie bacteriana mediante métodos convencionales no reveló metabolismo fermentativo de glucosa y fue negativa a las pruebas de indol, citrato y generación de ácido en inositol, lactosa, manitol y sorbitol. Asimismo, presentó positividad a las pruebas de citocromo oxidasa, maltosa y producción de hidrógeno sulfurado, guardando semejanza con lo reportado por varios autores (Kozinska & Pekala, 2004; Lu & Levin, 2010; Pekala *et al.*, 2015 y Kanchan & Kalawat, 2015).

Dicha cepa bacteriana se identificó mediante el sistema miniaturizado API 20 NE, evidenciando el perfil numérico 1410154, el cual coincidió con lo descrito por El-Barbary (2017) en cepas aisladas de tilapia. Con respecto a la caracterización bioquímica de *S. putrefaciens*, no presentó asimilación de la maltosa, divirgiendo con lo encontrado por Pezkala *et al.* (2015), quienes obtuvieron el perfil numérico 1410254.

En cuanto a la susceptibilidad de dicha cepa frente a diversos antimicrobianos exhibió sensibilidad ante florfenicol, flumequina, gentamicina y kanamicina, guardando similitud con Altun *et al.* (2014), Kozinska & Pekala (2004), Pazdzior (2016) y Pekala *et al.* (2015). Asimismo, mostró resistencia a ácido nalidíxico y sulfatrimetoprim, lo cual no coincide con la descripción de los autores anteriormente citados. Por otro lado, Pekala *et al.* (2015) y Altun *et al.* (2014) evaluaron cepas de *S. putrefaciens*, obteniendo halos intermedios y sensibilidad ante oxitetraciclina, difiriendo con lo observado en el presente estudio.

Cabe señalar que el aislado bacteriano identificado mediante pruebas bioquímicas fue ratificada molecularmente por la región 16S ARNr, lo cual guarda similitud con lo encontrado por El-Barbary (2017), quien describe que la secuencia parcial del gen 16S ARNr fue idéntica a la cepa *S. putrefaciens* (número de accesión LC208139) y mostró 100% de identidad a *S. putrefaciens* (DQ111774.1) que se encuentra en el Genbank.

En relación a los signos externos se apreció eritema en las aletas pectorales y alrededor del ano, lo cual no concuerda con lo reportado por otros autores (Altun *et al.*, 2014; Pazdzior, 2016; Pekala *et al.*, 2015) en diversas especies de peces. En cuanto a los signos internos, se observó hemorragias petequiales en gónadas y ascitis en la cavidad visceral, siendo similar a lo encontrado por Kozinska & Pekala (2004), Altun *et al.* (2014) y Pekala *et al.* (2015) en otras especies. El hallazgo de ascitis se puede atribuir a cambios vasculares en la permeabilidad de los vasos sanguíneos, provocando la acumulación de fluidos en la cavidad peritoneal (Saeed *et al.*, 1990).

Saeed *et al.* (1990) realizaron estudios histopatológicos en pez conejo, describiendo edema alrededor de los túbulos renales, lo cual coincide con lo observado en el presente trabajo.

A nivel de parénquima esplénico se observó congestión como componente del proceso inflamatorio, pudiendo progresar hasta la aparición de edema según lo descrito por Saeed *et al.* (1990).

Cabe recalcar que se presentaron lesiones en otros tejidos como necrosis de hepatocitos, riñón anterior y folículos gonadales que no han sido hallados por Saeed *et al.* (1990) y Altun *et al.* (2014).

6.1.7 *Shewanella algae*

Con respecto a las características bioquímicas de cepas bacterianas de *S. algae*, mostraron positividad ante la producción de hidrógeno sulfurado y resultaron negativas a las pruebas de glucosa, lactosa, manitol, inositol, maltosa y producción de indol, lo cual guarda semejanza con lo descrito por diversos autores (Khashe & Janda, 1998; Holt *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2006; Beleneva *et al.*, 2009).

Según estudios realizados por Beleneva *et al.* (2009) las especies *S. algae* y *S. putrefaciens* poseen muchas características fenotípicas comunes, siendo difíciles de distinguir. Sin embargo, *S. algae* no puede formar ácidos a partir de carbohidratos, diferenciándose de *S. putrefaciens*, ya que esta última fermenta la maltosa, lo cual guarda similitud con lo encontrado en el presente trabajo.

Con respecto a la identificación de *Shewanella algae* mediante el Sistema API 20 E se obtuvo el perfil numérico 0400004, que corresponde a *Shewanella putrefaciens*, lo cual concuerda con lo descrito por Holt *et al.* (2005), quienes afirman que en la base de datos del API 20 E no se incluye a la bacteria *S. algae*. Cabe destacar que las cepas revelaron negatividad ante la prueba de citrato en el mencionado sistema, difiriendo con lo descrito por Cai *et al.* (2006).

En cuanto a la susceptibilidad antibiótica, las cepas aisladas mostraron sensibilidad ante gentamicina, kanamicina, flumequina y ácido nalidixico coincidiendo con lo señalado por Cai *et al.* (2006) y Holt *et al.* (2005). En el caso de oxitetraciclina, el 86% de las cepas presentaron sensibilidad, lo cual difiere con lo registrado por Fannesbech Vogel *et al.* (1997) quienes hallaron tolerancia ante tetraciclina. Asimismo, existen otros antibióticos sensibles como sulfatrimetoprim y florfenicol que no han sido evaluados por otros investigadores.

Cabe señalar que la identificación de *S. algae* mediante pruebas bioquímicas fue corroborada por la secuenciación de la región 16S ARNr y coincide con lo encontrado por Cai *et al.* (2006) quienes reportan que la secuencia parcial del gen 16S ARNr fue semejante a la cepa *S. algae* (número de accesoión DQ026023) y mostró 99% de identidad a *S. algae* (X81621) aislada de la superficie de sedimentos de pantanos.

Desde el enfoque patológico, los signos externamente apreciados en el presente trabajo fueron exoftalmia bilateral, eritema en las aletas pectorales y en el poro urogenital, los cuales no han sido reportados por otros autores.

En relación a los signos internos, se encontró fluido sanguinolento en el intestino y ascitis en la cavidad visceral, guardando semejanza con lo registrado por Chen *et al.* (2003). Asimismo, se observó congestión intestinal y gónadas hemorrágicas, los cuales no han sido descritos por otros autores. Con respecto a la presencia de fluido sanguinolento en el intestino y gónadas hemorrágicas, pueden ser atribuidas a la actividad hemolítica de la bacteria según Holt *et al.* (2005).

De acuerdo a las lesiones halladas en tejidos, la bacteria provocó reacción inflamatoria focal en el pericardio auricular y ventricular, así como en el miocardio. Asimismo, a nivel del intestino se observó severa reacción inflamatoria de la lámina propia y necrosis licuefactiva de las vellosidades. En tejido gonadal se presentó severa congestión y necrosis de folículos gonadales. Cabe mencionar que no existen estudios histopatológicos previos en otras especies.

6.1.8 *Aeromonas caviae*

Las características bioquímicas de las cepas bacterianas revelaron positividad ante las pruebas de manitol, sorbitol y citrato, resultando negativa a las pruebas de Voges Proskauer, producción de hidrógeno sulfurado e inositol, guardando similitud con lo encontrado por Abbott *et al.* (2003) y Austin & Austin (2012).

La identificación de los aislados bacterianos mediante el sistema API 20 NE obtuvieron el perfil bioquímico *Aeromonas hydrophila* / *A. caviae*, no diferenciándose ambas especies, lo cual concuerda con Ogden *et al.* (1993) y Bashir *et al.* (2005). Sin embargo, existen pruebas bioquímicas convencionales que permitieron diferenciar dichas especies, tales como la reacción negativa ante la producción de gas en glucosa, hidrógeno sulfurado y Voges Proskauer, lo cual concuerda con lo descrito por Ogden *et al.* (1993). De esta manera concluimos que la especie analizada corresponde a *A. caviae*.

En estudios efectuados por Ogara *et al.* (1998) y Ashiru *et al.* (2011) describen sensibilidad antibiótica ante sulfatrimetoprim y gentamicina, lo cual es similar a lo encontrado en esta investigación. Asimismo, algunas cepas bacterianas ofrecieron resistencia a ácido nalidíxico y oxitetraciclina concordando con lo referido por Hatha *et al.* (2005) y Ashiru *et al.* (2011).

Investigaciones realizadas por Hays *et al.* (2016) comprueban la identificación de *A. caviae* (número de accesoión KP262417.1) mediante la secuenciación de la región 16S ARNr, mostrando 100% de identidad con las secuencias comparadas en el Genbank, guardando semejanza con la técnica molecular usada para corroborar dicha especie en el presente estudio.

Con respecto al signo externo observado en los peces muestreados tenemos la presencia de hemorragias petequiales en el abdomen, lo cual coincide con lo hallado por Ogara *et al.* (1998) y Rehulka (2002). Asimismo, se presentó eritemas en las aletas pectorales y descarga sanguinolenta a través del ano, los cuales no han sido reportados por otros autores.

En cuanto a los signos internos, se apreciaron músculo esquelético y gónadas hemorrágicas, así como enteritis mucocatarral con sangre, guardando similitud con lo informado por Candan *et al.* (1995).

Desde el punto de vista histopatológico la bacteria provocó reacción inflamatoria y edema en el tejido cardiaco y gástrico como parte de la evolución del proceso infeccioso. Asimismo, a nivel de hígado, bazo y riñón anterior se

apreció congestión, coincidiendo con lo descrito por Ogara *et al.* (1998) en truchas.

En relación a las pruebas bioquímicas es importante considerar que no deben ser usadas como método fundamental para la clasificación bacteriana en investigaciones taxonómicas o sistemáticas, debiendo ser aplicadas previamente a los estudios taxonómicos a fin de describir especies bacterianas nuevas (Noguerola & Blanch, 2008). Por lo tanto, en la presente investigación se utilizó inicialmente pruebas bioquímicas, las cuales fueron preponderantes para identificar las cepas bacterianas y posteriormente realizar la confirmación de las mismas mediante técnicas moleculares basadas en Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y secuenciación del gen 16S ARN. Estos ensayos en los últimos años se perfilan como técnicas rápidas, de bajo costo, robustas y permiten establecer diferencias entre especies bacterianas (Castro, 2011).

6.2 ÁRBOL FILOGENÉTICO

Cada una de las bacterias aisladas correspondieron a su respectiva familia y se encontraron emparentadas entre sí.

Se observó relación entre las bacterias *E. tarda*, *C. freundii* y *P. shigelloides* por pertenecer a la familia Enterobacteriaceae.

Las cepas *E. tarda* 1, 3 y 2 se encontraron muy relacionadas a pesar de provenir de peces de distintos estanques (5, 14 y 13, respectivamente), las cuales fueron aisladas en el mes de enero del año 2015. Cabe señalar que las bacterias *E. tarda* 5 y 6 estuvieron muy relacionadas entre sí, ya que procedían del mismo estanque (13), pero de años distintos (octubre 2015 y marzo 2014). Se observó que existe mayor distancia entre *E. tarda* 1 y *E. tarda* 4 a pesar de haber sido aisladas del mismo estanque (5) en diferentes épocas del año 2015, indicando que podrían ser cepas distintas.

En el caso de *C. freundii* 1 y *C. freundii* (ATCC 8090) presentaron gran similitud entre sí. En cuanto a la comparación de *C. freundii* 1 con respecto a *C.*

freundii 2 existe mayor distancia, ya que ambas fueron aisladas de peces de los estanques 1 y 12 en diferentes meses del año 2014.

Con respecto a la bacteria *P. shigelloides* 4 que procedía del estanque 14, presentó vinculación con las cepas *P. shigelloides* 3, 1, 5 y 2, las cuales correspondían al estanque 1. Sin embargo, dichas cepas fueron aisladas en distintos años (2013 y 2014). A su vez *P. shigelloides* 2 fue similar a la cepa *P. shigelloides* (ATCC14029).

En cuanto a la cepa de *V. alginolyticus* (ATCC 17749) presentó semejanza con *V. alginolyticus* 1, al igual que *V. cholerae* (NR044853.1) con *V. cholerae* 1. Dicho género se distribuyó en el clado de la familia Vibrionaceae. Cabe destacar que se observó baja concordancia entre *V. cholerae* y *V. alginolyticus*, debido a que esta última bacteria conforma una de las once especies del clado Harveyi perteneciente a Vibrio Core Group y en el caso de *V. cholerae* se encuentra en el clado Cholerae (Sawabe *et al.*, 2007).

La bacteria *S. putrefaciens* (ATCC 8071) reveló gran afinidad con *S. putrefaciens* 1.

Con respecto a las cepas *S. algae* 4 y 7 exhibieron gran parecido, aunque procedían de estanques y meses distintos del año 2015. Asimismo *S. algae* 7 presentó similitud con *S. algae* 2, a pesar de proceder de diferentes estanques (5 y 18) y años (2015 y 2014). Cabe destacar que la cepa *S. algae* 2 presentó proximidad con *S. algae* (ATCC 51192) y a su vez esta con *S. algae* 3, la cual guarda estrecha relación con *S. algae* 6 y 5. Sin embargo, *S. algae* 3 provenía del estanque 8 y las otras dos cepas del estanque 14, siendo aisladas en enero del 2015. Asimismo, la cepa *S. algae* 5 presentó afinidad con *S. algae* 1, las cuales procedieron del mismo estanque (14) pero fueron aisladas en años distintos (2015 y 2014). Cabe señalar que las especies bacterianas *S. putrefaciens* y *S. algae* estuvieron muy emparentadas y se dispusieron en el clado de la familia Shewanellaceae.

En relación a las cepas de *Aeromonas caviae* que se aislaron en el mes de setiembre del 2014, se encontró que *A. caviae* 2 estuvo muy emparentada con *A. caviae* 1, a pesar de encontrarse en distintos estanques (11 y 14). Asimismo, dicha cepa presentó afinidad con *A. caviae* 5 y a su vez esta con *A. caviae* (ATCC 15468), la cual exhibió cercanía con *A. caviae* 3, recalcando que las bacterias *A. caviae* 5 y 3 pertenecieron al estanque 16. Asimismo, se apreció la relación entre *A. caviae* 3 y *A. caviae* 4, las cuales provenían de diferentes estanques (16 y 14). Se observó que existe mayor distancia entre *A. caviae* 1 y *A. caviae* 4 a pesar de haber sido aislada del mismo estanque en setiembre del año 2014. Cabe mencionar que el género bacteriano *Aeromonas* se halló en un clado distinto al de la familia Enterobacteriaceae.

6.3 CARACTERÍSTICAS DE LA CALIDAD DEL AGUA

En cuanto a los valores de los parámetros físico – químicos del agua se registró un promedio de 0,1 mg/l de amonio no ionizado (NH₃), el cual se encuentra dentro de los niveles de tolerancia para el crecimiento de tilapia (0,01 a 2 mg/l) (Nicovita, 2013). En el caso del nitrito fue de 0,7 mg/l siendo normal para el sistema biofloc (0,5 a 2 mg/L) según Kubitza (2011). El pH de 7,8 se encontró dentro de los niveles óptimos (6,5 a 9) recomendados por Nicovita (2013). El oxígeno disuelto fue de 4,3 mg/l, considerándose como un valor óptimo para la especie en comparación con lo sugerido por Nicovita (2013) (3.0 – 4.0 mg/l).

Estudios efectuados por diversos autores (El-Sherif & El-Feky, 2008; Yoon *et al.*, 2015) en tilapias expuestas de forma crónica a concentraciones de 0,05 y 1,5 mg/l de amonio no ionizado en el agua, revelaron cambios en tejido branquial como: hiperplasia de las lamelas secundarias, congestión, edema y telangiectasia, lo cual guarda semejanza con lo encontrado en el presente trabajo en peces infectados por *P. shigelloides*, *S. putrefaciens*, *S. algae*, *A. caviae*, *V. alginolyticus* y *V. cholerae*, los cuales fueron mantenidos en un rango de amonio no ionizado de 0,04 a 0,13 mg/l. Asimismo, se observó la presencia de trematodes monogeneos en peces enfermos con *P. shigelloides* y *V. cholerae*. Cabe destacar que dichos parásitos constituyen parte de la helmintofauna en

tilapias y podrían provocar daños si la infestación fuese elevada de acuerdo a lo descrito por Gomez *et al.* (2016).

6.4 FRECUENCIA DE PECES CON SÍNTOMAS DE ENFERMEDAD

En relación a la Tabla 48 sobre la frecuencia de peces con síntomas de enfermedad por estadio de producción en las fases de alevinaje, crecimiento y comercial fue de 0, 24 y 52%, respectivamente, presentándose peces enfermos sólo en crecimiento y comercial, posiblemente por los diversos puntos críticos encontrados en el manejo sanitario de la piscigranja evaluada.

6.4.1 FACTORES ASOCIADOS A LA PRESENCIA DE PECES SINTOMÁTICOS

Con respecto a la Tabla 54 sobre el estado de infección bacteriana de peces en relación a la temperatura del agua, cabe destacar que los animales enfermos se encontraron en estanques con agua, cuya temperatura fue mayor con respecto al agua de los estanques de peces aparentemente sanos. Cabe señalar que la presencia de animales sintomáticos se debe a factores desencadenantes de estrés como el incremento de la temperatura del agua en los sistemas de cultivo coincidiendo con lo informado por Cruz *et al.* (1986) y Austin *et al.* (1993).

En relación a la aparición de brotes de edwardsiellosis, se dió en el rango de 29,6 a 32 °C de temperatura del agua, lo cual difiere con lo descrito por Bullock (1985) quien observó la presencia de la enfermedad a una temperatura de 27 °C en trabajos de infección experimental en lubina negra (*Morone saxatilis*) y bagre de canal (*Ictalurus punctatus*).

En cuanto a la aparición de brotes de shewanelosis se presentó a una temperatura del agua de 25,8 °C, lo cual diverge con lo referido por Pekala *et al.* (2015), quienes observaron la presencia de la enfermedad a 10 °C en cultivo de carpa común (*C. carpio*) y trucha arco iris (*O. mykiss*).

De acuerdo con la aparición de brotes de citrobacteriosis en los peces evaluados, se observó la presencia de la misma a una temperatura del agua de

25,8 a 28,5 °C, siendo discordante con lo encontrado por Svetlana *et al.* (2003), quienes efectuaron infecciones experimentales en ciprinidos y trucha arco iris, manifestándose la enfermedad a 11 °C y 10 °C, respectivamente.

Con respecto a la aparición de brotes de vibriosis en relación a la temperatura del agua de cultivo, se observó que la temperatura estuvo a 28 °C, lo cual concuerda con lo descrito en ayu (*P. altivelis*) por Rehulka *et al.* (2015), quienes mencionaron que se presentó dicha patología cuando la temperatura del agua de los ríos fue 22 °C o mayor.

6.5 MANEJO SANITARIO DEL CENTRO DE CULTIVO

Cabe señalar que la adopción de medidas de bioseguridad en un sistema de cultivo constituye una actividad indispensable para prevenir la aparición de brotes de enfermedad. Habiéndose observado en el manejo sanitario de la piscigranja evaluada diversos puntos críticos durante la fase de alevinaje tales como: el uso de la misma red para la manipulación de peces en todos los tanques de la unidad sin haber efectuado previamente su limpieza y desinfección después de ser utilizada, la cual podría estar contaminada por peces infectados y actuar como un fómite en la transmisión de enfermedades, concordando con lo descrito por Ministry for Primary Industry (2016), siendo de especial importancia tener cuidado en esta fase, ya que dichos animales son los más vulnerables a cualquier brote de enfermedad.

En las salas de crecimiento y comercial se apreció la ausencia de pediluvios y maniluvios en la entrada de las áreas de producción, actuando las manos y botas como fómites capaces de transportar organismos patógenos a otras áreas, así como la permanencia de peces enfermos o moribundos durante el día, lo cual constituye un foco de infección para los animales sanos según lo reportado por FAO (2004). Asimismo, la manipulación de peces mediante el uso compartido de la misma red en todas las pozas de una misma área de producción, sin realizar previamente su limpieza y desinfección después de haber sido usada. Dicha red podría estar contaminada por peces infectados y actuar como fómite, lo cual coincide con lo descrito por SCAAH (2017).

En cuanto a la indumentaria (botas y mameluco) que utilizaban los trabajadores y los visitantes en la piscigranja era la apropiada, ya que era de uso exclusivo en la empresa.

Con respecto al agua que se usaba como afluente en todas las salas de producción provenía de pozo y no constituía ningún riesgo en el ingreso de patógenos a los cultivos, al igual que el efluente, el cual servía para el riego de áreas verdes cuando culminaba el periodo de producción.

VII. CONCLUSIONES

1. La caracterización fenotípica de patógenos bacterianos aislados de tilapia en la piscigranja corresponden a una gran diversidad de géneros, tales como: *Edwardsiella tarda*, *Citrobacter freundii*, *Plesiomonas shigelloides*, *Vibrio alginolyticus*, *V. cholerae*, *Shewanella putrefaciens*, *S. algae* y *Aeromonas caviae*.
2. La identificación fenotípica de las bacterias aisladas es confirmada mediante la secuenciación del gen 16S ARNr.
3. Las cepas aisladas de *E. tarda*, *V. alginolyticus* y *V. cholerae* presentan sensibilidad antibiótica *in Vitro* frente a los antimicrobianos ácido nalidíxico, florfenicol, flumequina, gentamicina, kanamicina, oxitetraciclina y sulfatrimetoprim. Sin embargo, algunas de las cepas de *C. freundii*, *P. shigelloides*, *S. putrefaciens* y *A. caviae* muestran resistencia a oxitetraciclina y ácido nalidíxico.
4. Las lesiones histopatológicas más frecuentes ocasionadas por las bacterias *V. cholerae* y *A. caviae* provocan edema focal en la lámina propia del estómago; *V. alginolyticus*, *V. cholerae* y *S. putrefaciens* causan necrosis de los hepatocitos; *P. shigelloides* y *A. caviae*, necrosis de vellosidades intestinales; *E. tarda* y *V. cholerae*, necrosis focal de los túbulos renales. Asimismo, las bacterias *S. putrefaciens* y *S. algae* originan necrosis de folículos gonadales y congestión de vasos sanguíneos, generando en último término cuadros septicémicos en los especímenes afectados.
5. La mayor frecuencia de animales con síntomas de enfermedad se da por los patógenos bacterianos *S. algae*, *E. tarda*, *P. shigelloides* y *A. caviae*, presentándose principalmente durante las fases de crecimiento (*A. caviae* con 12%) y comercial (*S. algae* con 16,7%, *E. tarda* con 11,9% y *P. shigelloides* con 9,5%).
6. En el manejo sanitario de las áreas de producción de la piscigranja estudiada se observa distintos puntos críticos de contaminación, tales

como: ausencia de implementos de desinfección (maniluvio y pediluvio) y falta de remoción de animales moribundos o muertos en las salas de crecimiento y comercial, así como la utilización de redes compartidas entre los estanques en las salas de alevinaje, crecimiento y comercial.

VIII. RECOMENDACIONES

- Elaborar un manual sobre medidas de bioseguridad y prevención de enfermedades en el centro de cultivo de tilapias.
- Realizar programas de monitoreo periódico en la piscigranja a cargo de un veterinario con la finalidad de detectar enfermedades de riesgo.
- Contar con personal especializado en cultivo de peces capacitado en conocimientos de microbiología.
- Adoptar medidas de prevención durante todas las etapas productivas de cultivo, ya que no será posible la aplicación de terapias antibióticas debido a que en el sistema biofloc se forman bacterias heterótrofas encargadas de utilizar los productos nitrogenados provenientes de la descomposición de heces y materia orgánica, siendo el uso de antimicrobianos extremadamente peligroso, ya que se eliminaría la totalidad de dichas bacterias.
- Desarrollar protocolos de preparación de vacunas contra las bacterias patógenas identificadas con la finalidad de aplicarlas, siendo una importante alternativa de prevención de enfermedades infecciosas.
- Se plantea para investigaciones futuras, utilizar la técnica PCR de punto final, la cual utiliza primers específicos que identifican de manera confiable y en menor tiempo (24 horas) las bacterias aisladas, siendo beneficioso en caso de grandes mortalidades producto de brotes epizooticos en piscigranjas de peces, ya que permite identificar de manera rápida al patógeno causante de una epizootia a fin de tomar las medidas de control y prevención. De esta manera disminuirían las pérdidas económicas, las cuales ocurren debido al retraso en el diagnóstico de enfermedades y rápida intervención.
- Las bacterias oportunistas *E. tarda*, *P. shigelloides*, *A. caviae* y *V. cholerae* aisladas de peces representan un riesgo para salud del hombre, el cual adquiere dichos patógenos al consumir peces insuficientemente cocidos,

provocandole brotes de enfermedad, por lo cual se recomienda comer peces apropiadamente cocidos (WHO, 1999; Novotny *et al.*, 2004).

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, S. L., CHEUNG, K. W., JANDA, J. M. 2003. The genus *Aeromonas*: Biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *J. Clin. Microbiol.* 41 (6): 2348 – 2357.
- ABDALAH, F. B., CHAIEB, K., ZMANTAR, T., KALLEL, H., BAKHROUF, A. 2009. Adherence assays and slime production of *Vibrio alginolyticus* and *Parahaemolyticus*. *Braz. J. Microbiol.* 40: 394-398.
- ALTUN, S., BÜYÜKEKİZ, G. A., DUMAN, M., ÖZYIĞIT, O. M., KARATAŞ, S., TURGAY, E. 2014. Isolation of *Shewanella putrefaciens* from Goldfish (*Carassius auratus auratus*). *Isr. J. Aquac.* 66: 1-7.
- AMANDI, A., HIU, S. F., ROHOVEC, J. S., FRYER, J. L. 1982. Isolation and characterization of *Edwardsiella tarda* from fall chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Appl. Environ. Microbiol.* 43:1380–1384.
- AMOS, K. H. 1985. Procedures for the Detection and Identification of Certain Fish Pathogens. 3rd edition. Fish Health Section, American Fisheries Society. Corvallis, Oregon.
- ANA. 2009. Mapa hidrográfico del Perú.
>https://www.ana.gob.pe/sites/default/files/normatividad/files/mapa_hidrografico_0_0_2.pdf<
Acceso: 20/04/2019.
- ARIEL, E., OWENS, L. 1997. Epizootic mortalities in tilapia *Oreochromis mossambicus*. *J. Dis. Aqua. Org.* 29: 1-6.
- ASHIRU, A. W., UABOI-EGBENI, P. O., OGUNTOWO, J. E., IDIKA, C. N. 2011. Isolation and antibiotic profile of *Aeromonas* species from tilapia fish (*Tilapia nilotica*) and catfish (*Clarias betrachus*). *Pak. J. Nutr.* 10 (10): 982-986.
- AUSTIN, B., STOBIE, M., ROBERTSON, P. 1992. *Citrobacter freundii*: the cause of gastroenteritis leading to progressive low level mortalities infarmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss walbaum*, in Scotland. *Bull Eur Ass Fish Pathol.* 12 (5): 166 – 168.
- AUSTIN, B., STOBIE, M., ROBERTSON, P. A., GLASS, H. G., STARK, J. R. 1993. *Vibrio alginolyticus*: the cause of gill disease leading to progressive low-

level mortalities among juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L., in a Scottish aquarium. J. Fish Dis. 16: 277-280.

- AUSTIN, B., AUSTIN, D. A. 2007. Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish. 4th ed. Praxis. Chichester, United Kingdom. 552 pp.
- AUSTIN, B., AUSTIN, D. A. 2012. Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish. 5th ed. Springer Netherlands. New York, London. 654 pp.
- AVNIMELECH, Y., KOCHVA, M., DIAB, S. 1994. Development of controlled intensive aquaculture systems with a limited water exchange and adjusted carbon to nitrogen ratio. Bamidgeh. 46: 119–131.
- AVNIMELECH, Y. 1999. Carbon and nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. Aquaculture. 176: 227–235.
- BALEBONA, M. C., ANDREU M. J., BORDAS, M. A., ZORRILLA, I., MORIÑIGO, M. A., BORREGO, J. J. 1998. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for Cultured Gilt-Head Sea Bream (*Sparus aurata* L.). Appl. Environ. Microbiol. 64 (11): 4269-4275.
- BALTAZAR, P. M. 2009. Situación Actual de la Tilapia en el Perú. Segunda Jornada de Actualización en Tilapia, Puerto Vallarta, México.
- BASHIR, A. M., AHMED, M. M., BARI, A., SAAD, A. M. 2005. Biochemical characterization of the Aeromonas species isolated from food and environment. Pak. J. Physiol. 1: 1-2.
- BELENEVA, I. A., MAGARLAMOV, T. Y., ELISEIKINA, G. M., ZHUKOVA, V. N. 2009. Biochemical and pathogenic properties of the natural isolate of *Shewanella algae* from Peter the Great Bay, Sea of Japan. J. Invertebr. Pathol. 102: 250–255.
- BENITES DE PADUA, S., MARQUES, P. D., SEBASTIAO, A. F., PILARSKI, F., MARTINS, L. M., ISHIKAWA, M. M. 2014. Isolation, characterization and pathology of *Citrobacter freundii* infection in native brazilian catfish *Pseudoplatystoma*. Braz. J. Vet. Pathol. 7 (3): 151 – 157.
- Bluebook. 2011. Suggested Procedures for the Detection and Identification of Certain Finfish and Shellfish Pathogens. American Fisheries Society.

- BOSSIER, P., EKASARI, J. 2017. Biofloc technology application in aquaculture to support sustainable development goals. *Microbial Biotechnology*. 10 (5): 1012-1016.
- BRAVO, F. L., CORREA, M. Y., CLAUSELL, I. J., FERNÁNDEZ, A. A., RAMÍREZ A. M., NÚÑEZ, F. F., LEDO, G. Y., CRUZ, I. Y. 2009. Caracterización de factores de virulencia y susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Plesiomonas shigelloides* aisladas de pacientes con diarrea aguda en Cuba. *Rev Chil Infect*. 26 (3): 233-238.
- BRUNO D. W. 1996. Nephrocalcinosis. *Aquaculture Information Series*. Marine Laboratory, Aberdeen. 16: 1-5.
- BULLER, N. B. 2014. *Bacteria and Fungi from Fish and Other Aquatic Animals*. 2nd ed. British library. UK. London. 920 pp.
- BULLOCK, G. L. 1977. Vibriosis in fish. *Fish Disease Leaflet 50*. United States Department of the Interior. 1-11.
- BULLOCK, G. L., HERMAN, R. L. 1985. *Edwardsiella* infections of fishes. *Fish Disease Leaflet 71*. United States Department of the interior. 1-8.
- CAI, J., CHEN, H., THOMPSON, K. D., LI, C. 2006. Isolation and identification of *Shewanella alga* and its pathogenic effects on post-larvae of abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *J. Fish Dis*. 29: 505–508.
- CANDAN, A., KÜÇÜKER, M; KARATAS, S. 1995. Motile aeromonad septicemia in *Salmo salar* cultured in the Black sea in Turkey. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol*. 15 (6): 195-196.
- CAO, H., LONG, X., LU, L., YANG, X., CHEN, B. 2016. *Citrobacter freundii*: a causative agent for tail rot disease in freshwater cultured Japanese eel *Anguilla japonica*. *Isr. J. Aquac*. 68: 1-7.
- CASTRO, I. N. 2011. *Edwardsiella tarda*: patógeno emergente en el cultivo del rodaballo. Tesis doctoral. Universidad Santiago de Compostela.
- CHATTERJEE, S., HALDAR, S. 2012. Vibrio related diseases in aquaculture and development of rapid and accurate identification methods. *J. Marine Sci. Res. Dev*. S1: 002.

- CHEN, C., HU, C. Q., CHEN, X. Y., ZHANG, L. P. 2003. Identification and characterization of *Shewanella algae* as a novel pathogen of ulcer disease of fish *Scinenops ocellata*. *Oceanol. Lymnol. Sin.* 34 (1): 1-8.
- CLAESSION, B. E., HOLMLUND, D. E., LINDHAGEN, A., MATZSCH, T. W. 1984. *Pleiomonas shigelloides* in acute cholecystitis: a case report. *J. Clin. Microbiol.* 20 (5): 985-987.
- CLAVIJO, A. M., CONROY, G., CONROY, D. A., SANTANDER, J., APONTE, F. 2002. First report of *Edwardsiella tarda* from tilapias in Venezuela. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 22 (4): 280.
- COLECCIÓN FAO CAPACITACIÓN. Gestión de la piscicultura de agua dulce: granjas acuícolas y sus poblaciones de peces. 21 (2).
>http://www.fao.org/fishery/static/FAO_Training/FAO_Training/General/x6709s/index.htm<
Acceso: 16/03/2019.
- CONG, Y., WANG, J., CHEN, Z., XIONG, K., XU, Q., HU, F. 2011. Characterization of swarming motility in *Citrobacter freundii*. *FEMS Microbiol Lett.* 137: 160-171.
- CONROY, G., CONROY, D. 2006. Bacterial haemorrhagic septicaemia in tilapias. *Aquaculture Health International.* 7: 7-8
- CONROY, D. 2007a. Mycobacteriosis as a potentially important tilapia disease. *Aquaculture Health International.* 9: 14-15.
- CONROY, G. 2007b. The *Streptococcus* "milleri" group in tilapias: more than a mere mouthful. *Aquaculture Health International.* 10: 19-20.
- CONROY, G. 2009. Principales enfermedades bacterianas en tilapias.
http://www.ciabcr.com/charlas/Acuacultura%20062009/Principales_enfermedades_bacterianas_en_tilapias-Dra._Gina_C.pdf
Acceso: 17/01/2017.
- CORRAL, Y., CORRAL I., FRANCO, A. 2015. Procedimientos de muestreo. *Revista Ciencias de la Educación.* 26 (46): 151-167.
<<http://servicio.bc.uc.edu.ve/educacion/revista/46/art13.pdf>>
Acceso: 27/04/2019.

- CRAB, R., KOCHVA, M., VERSTRAETE, W., AVNIMELECH, Y. 2009. Bio-flocs technology application in over-wintering of tilapia. *Aquac. Eng.* 40: 105-112.
- CRUZ, J. M., SARAIVA, A., EIRAS, J. C., BRANCO, R., SOUZA, J. C. 1986. An outbreak of *Plesiomonas shigelloides* in farmed rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in Portugal. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 6 (1): 20-22.
- DE BLAS, I., RUIZ-ZARZUELA, I., VALLEJO, A. 2006. WinEpi: Working In Epidemiology. An Online Epidemiological Tool. 11 International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics. Universidad de Zaragoza, España.
> www.sciquest.org.nz<
Acceso: 20/04/2019
- DEMARTA, A., TONOLLA, M., CAMINADA, A. P., RUGGERI, N., PEDUZZI, R. 1999. Signature region within the 16S rDNA sequences of *Aeromonas popoffii*. *FEMS Microbiol Lett.* 172: 239–246.
- DERIS, Z. Z., LEOW, V. M., HASSAN, W. W., LAH, N. N., LEE, S. Y., HAWA, S. H., ASMA, S. H., RAVICHANDRAN, M. 2009. Non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* bacteraemia in splenectomised thalassaemic patient from Malaysia. *Trop. Biomed.* 26 (3): 320–325.
- DIAS, C., MOTA, V., MARTÍNEZ - MURCIA, A., SAAVEDRA, M. J. 2012. Antimicrobial resistance patterns of *Aeromonas* spp. isolated from ornamental fish. *J. Aquacult. Res. Dev.* 3: 131.
- DULANTO, G. J., LEÓN, Q.J., ALFARO, A. R. 2013. Identificación rápida de especies del género *Vibrio* asociadas con el cultivo de “langostino blanco” *Litopenaeus vannamei* por amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). [Tesis Bach]. Fac Biol: Univ Nacional Mayor de San Marcos. 109.
- EL-BARBARY, M. 2017. First recording of *Shewanella putrefaciens* in cultured *Oreochromis niloticus* and its identification by 16Sr RNA in Egypt. *Egypt. J. Aquat. Res.* 43: 101-107.
- EL-BARBARY, M., HAL, A. 2017. Molecular identification and pathogenicity of *Citrobacter* and *Serratia* species isolated from cultured *Oreochromis niloticus*. *Egypt J. Aquat. Res.*
><https://doi.org/10.1016/j.ejar.2017.09.004><
Acceso: 26/03/2018.

- EL DEEN AIE, N., EL-GOHARY, M. S., ABDOU, M. S., EL-GAMAL, A. M. 2017. Molecular characterization of *edwardsiella tarda* bacteria causing severe mortalities in cultured *Oreochromis niloticus* fish with treatment trials. Int. J. Curr. Res. 9 (5): 50962-50969.
- EL-SEEDY, F. R., RADWAN, I. A., ABD EL-GALIL, M. A., SAYED, H. H. 2015. Phenotypic and Genotypic characterization of *Edwardsiella tarda* isolated from *Oreochromis niloticus* and *Clarias gariepinus* at Sohag Governorate. J. Am. Sci. 11 (11): 68-75.
- EL-SHERIF, M. S., EL-FEKY, A. M. 2008. Effect of ammonia on the Nile Tilapia (*O. niloticus*) performance and some hematological and histological measures. Eighth International Symposium on Tilapia in Aquaculture. 513- 530.
- EL-YAZEED, H. A., IBRAHEM, M. D. 2009. Studies on *Edwardsiella tarda* infection in catfish and tilapia nilotica. J. BS. Vet. Med. 19 (1): 44-50.
- EMERENCIANO, M., GAXIOLA, G., CUZON, G. 2013. Biofloc Technology (BFT): A Review for Aquaculture Application and Animal Food Industry. In: Matovic, M (ed.) Intech. First edit. Croacia: InTech, pp. 301 - 328.
- EVANS, J. J., KLESIOUS, P. H., SHOEMAKER, C. A. 2006. *Streptococcus* in warm-water fish. Aquaculture Health International. 7: 10-14.
- FAO. 2004. Manejo sanitario y mantenimiento de la bioseguridad de los laboratorios de postlarvas de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) en América Latina. Doc. Técnico de Pesca 450. Roma. 66 pp.
- FAO. 2005. (en línea). Programa de información de especies acuáticas *Oreochromis niloticus*. Texto de Rakocy, J. E. In: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma. <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/es#tcNA0053>. Acceso: 13/03/2015.
- FAO. 2018. (en línea). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Roma. 234 pp. <<http://www.fao.org/3/I9540ES/i9540es.pdf>> Acceso: 9/03/2019.

- FITZSIMMONS, K. 2016. Supply and demand in global tilapia markets 2015. World Aquaculture Society.
>https://www.researchgate.net/publication/281241348_Global_Tilapia_Market_update_2015<
Acceso: 9/03/2018.
- FONNESBECH VOGEL, B., JORGENSEN, K., CHRISTENSEN, H., ELMERDAHL OLSEN, J., GRAM, L. 1997. Differentiation of *Shewanella putrefaciens* and *Shewanella alga* on the Basis of Whole-Cell Protein Profiles, Ribotyping, Phenotypic Characterization, and 16S rRNA Gene Sequence Analysis. J. Appl. Environ. Microbiol. 2189-2199.
- GOMEZ, L., MEJÍA, M. E., RODRÍGUEZ, A. G., GUADALUPE, M. 2016. Prevalencia de parásitos helmintos en peces de agua dulce del embalse Cerrón Grande de El Salvador. [Tesis para optar el título]. Universidad de El Salvador.
- GONZALES - REY, C. 2003. Studies on *Plesiomonas shigelloides* isolated from different environments. [Doctoral thesis]. Swedish University of Agricultural Sciences.
- GRIMONT, P. A, GRIMONT, F., RICHARD, C., SAKAZAKI, R. 1980. *Edwardsiella hoshinae*, a new species of *Enterobacteriaceae*. Curr. Microbiol. 4: 347-351.
- GUSTINCICH, S., MANFIOLETT, G., DEL SAL, G., SCHNEIDER, C., CARNICI, P. 1991. A fast method for high quality genomic DNA extraction from whole human blood. BioTechniques. 11 (3): 298-302.
- HABTAMU, T., KEBEDE, B. 2016. Screening for the presence and prevalence of *Edwardsiella tarda* infection in fish harvested from lakes Zeway and Langano, southern Oromia, Ethiopia. Cogent Food and Agriculture. 2: 1-9.
- HASSAN, A. H. M., NOOR-EL DEEN, A. E., GALAL, H. M., SOHAD, M. D. BAKRY, M. A., HAKIM, A. S. 2012. Further characterization of Enterobacteriaceae isolated from cultured freshwater fish in Kafr El Shiek Governorate: Clinical, biochemical and histopathological study with emphasis of treatment trials. Glob Vet. 9 (5): 617-329.

- HATHA, M; VIVEKANANDHAN, A; CHRISTOL, J. 2005. Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fish. *Int. J. Food. Microbiol.* 98: 131-134.
- HAYS, H. H., JASIM, H. M., ABDULJABAR, R. A. 2016. Isolation and molecular identification of aquatic bacteria from Tigris river within Wasit province. *World Journal of Pharmaceutical Research (WJPR)*. 5 (12): 1438-1444.
- HOLT, H. M. GAHRN-HANSEN, B., BRUUN, B. 2005. *Shewanella algae* and *Shewanella putrefaciens*: clinical and microbiological characteristics. *Clin Microbiol Infect.* 11: 347-352.
- HUANG, S. L., CHEN, W. C., SHEI, M. C., LIAO, I. C., CHEN, S. N. 1999. Studies on epizootiology and pathogenicity of *Staphylococcus epidermidis* in tilapia (*Oreochromis spp.*) cultured in Taiwan. *Zoological Studies.* 38: 178-188.
- HUQ, A., HALEY, B. J., TAVIANI, E., CHEN, A., HASAN, N. A., COLWELL, R. R. 2012. Detection, Isolation, and Identification of *Vibrio cholerae* from the Environment. *Curr. Protoc. Microbiol.* 1-58.
- INGLIS, V; ROBERTS, J. R; BROMAGE, R. N. 2001. Bacterial diseases of fish. 1st ed. Blackwell science Ltd. Oxford. 312 pp.
- IREGUI, C. A., GUARÍN, M., TIBATÁ, V. M., FERGUSON, H. W. 2012. Novel brain lesions caused by *Edwardsiella tarda* in a red tilapia (*Oreochromis spp.*). *J. Vet. Diagn. Invest.* 24 (2) 446–449.
- IVANOVA, E. P., FLAVIER, S., CHRISTEN, R. 2004. Phylogenetic relationships among marine Alteromonas-like proteobacteria: emended description of the family Alteromonadaceae and proposal of Pseudoalteromonadaceae fam. nov., Colwelliaceae fam. nov., Shewanellaceae fam. nov., Moritellaceae fam. nov., Ferrimonadaceae fam. nov., Idiomarinaceae fam. nov. And Psychromonadaceae fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1773–1788.
- JAGGER, D. T. 2000. *Plesiomonas shiguelloides* – a veterinary perspective. *Infect. Dis. Rev.* 2 (4): 199-210.
- JANDA, J. M., ABBOTT, S. L., KROSKE-BYSTROM, S., CHEUNG, W. K., POWERS, C., KOKKA, R. P., TAMURA, K. 1991. Pathogenic properties of *Edwardsiella* species. *J. Clin. Microbiol.* 29: 1997-2001.

- JANDA, J. M., ABBOTT, S. L. 1993. Infections associated with the genus *Edwardsiella*: the role of *Edwardsiella tarda* in human disease. *Clinical Infectious Diseases* 17: 742–74.
- JANDA, J. M., ABBOTT, S. L. 2010. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. *American Society for Microbiology*. 23 (1): 35 – 73.
- JANDA, J. M., ABBOTT, S. L., MCLEVER, C. J. 2016. *Plesiomonas shigelloides* Revisited. *Clin Microbiol Rev*. 29 (2): 349-74.
- JENEY, G. 2017. *Fish Diseases Prevention and Control Strategies*. Academic press. United Kingdom. 264 pp.
- JOH, S. J., KIM, M. J., KWON, H. M., AHN, E. H., JANG, H., KWON, J. H. 2011. Characterization of *Edwardsiella tarda* isolated from farm cultured eels, *Anguilla japonica*, in the Republic of Korea. *J. Vet. Med. Sci.* 73 (1): 7-11.
- JOSEPH, S. W., CARNAHAN, A. 1994. The isolation, identification, and systematics of the motile *Aeromonas* species. *Annu Rev Fish Dis*. 4: 315-343.
- KHASHE, S., JANDA, J. M. 1998. Biochemical and Pathogenic Properties of *Shewanella alga* and *Shewanella putrefaciens*. *J. Clin. Microbiol.* 783-787.
- KANCHAN, S. K., KALAWAT, U. 2015. Emerging Infections: *Shewanella* – A Series of Five Cases. *J. Lab. Physicians*. 2 (2): 61- 65.
- KIIYUKIA, C., NAKAJIMA, A., NAKAI, T., MUROGA, K., KAWAKAMI, H., HASHIMOTO, H. 1992. *Vibrio cholera* Non-01 isolated from diseased ayu fish (*Plecoglossus altivelis*) in Japan. *American Society for Microbiology*. 58 (9): 3078-3082.
- KLEIN, B. U., KLEINGELD, D. W., BOHM, K. H. 1993. First isolation of *Plesiomonas shigelloides* from sample of cultured fish in Germany. *Bull. Eur Ass. Fish Pathol.* 13 (2): 70-72.
- KOZINSKA, A., PEKALA, A. 2004. First isolation of *Shewanella putrefaciens* from freshwater fish – a potential new pathogen of fish. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 24 (4): 189.
- KOZINSKA, A., PEKALA, A. 2010. Serotyping of *Aeromonas* species isolated from polish fish farms in relation to species and virulence phenotype of the bacteria. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*. 54: 315-320.
- KRUPESHA SHARMA, S. R., RATHORE, G., VERMA, D. K., SADHU, N., KURIAKOSE, P. K. 2013. *Vibrio alginolyticus* infection in Asian seabass (*Lates*

- calcarifer*, Bloch) reared in open sea floating cages in India. *Aquac. Res.* 44: 86–92.
- KUBITZA, F. 2011. Cultivo de tilapias en sistema de bioflocos, sin renovación de agua. *Panorama da Acuicultura*.
><https://www.google.com.pe/webhp?sourceid=chrome-instant&ion=1&espv=2&ie=UTF-8#q=kubitza+2011+biofloc+tilapias><
Acceso: 9/02/2016.
 - KUSUDA, R., TOYOSHIMA, T., IWAMURA, Y., SAKO, H. 1976. *Edwardsiella tarda* from an epizootic of mullets (*Mugil cephalus*) in Okitsu Bay. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 42: 271-275.
 - LARKIN, M. A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N. P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P. A., MCWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I. M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., HIGGINS, D. G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 23 (21): 2947-8.
 - LATERÇA, M. M., MAKOTO Y. D., PEDREIRA, M. J. 2008. *Aeromonas caviae* durante surto de mortalidade em tilapia do Nilo e suplementação com vitamina C na dieta. *B. Inst. Pesca, São Paulo.* 34 (4): 585 – 590.
 - LEKANG, O. I. 2013. *Aquaculture Engineering.* 2nd ed. Wiley Blackwell. Norway. 403 pp.
 - LEE, S. W., NAJIAH, M., CHUAH, T. S., NOOR AZHAR, M. S., WENDY, W., NADIRA, M. AND MOHD, E. A. W. 2011. Antibigram and Plasmid Profiling from *Edwardsiella tarda* Isolated from Freshwater Fish in East Coast Malaysia. *Journal of Sustainability Science and Management (JSSM).* 6: 19-27.
 - LING, S. H., WANG, X. H., XIE, L., LIM, T. M., LEUNG, K. Y. 2000. Use of green fluorescent protein (GFP) to track the invasive pathways of *Edwardsiella tarda* in the in vivo and in vitro fish models. *Microbiology.* 146: 7-19.
 - LIU, P. C., LIN, J. Y., HSIAO, P. T., LEE, K. K. 2004. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio alginolyticus* from diseased cobia *Rachycentron canadum*. *J. Basic Microbiol.* 44 (1): 23–28.
 - LIU, Z., KE, X., LU, M., GAO, F., CAO, J., ZHU, H., WANG, M. 2015. Identification and pathological observation of a pathogenic *Plesiomonas*

shigelloides strain isolated from cultured tilapia (*Oreochromis niloticus*). Acta Microbiol. Sin. 55 (1), 96–106.

- LU, SH., LEVIN, E. R. 2010. *Shewanella* in a tilapia fish farm. J. Fish Sci. 4 (2): 159-170.
- LUNA, L. G. 1968. Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. 3 rd. ed. Mc Graw-Hill. New York. 32-38.
- MAHESHWARI, M., KRISHNAIAH, N., RAMANA, D. B. V. 2011. Evaluation of Polymerase Chain Reaction for the detection of *Vibrio cholerae* in Contaminants. Ann Biol Res. 2 (4): 212-217.
- MARTINS, M. L., MOURIÑO, J. L. P., FEZER, J. F., BUGLIONE, NETT, C. C., GARCIA, P., SILVA, B. C., JATOBÁ, A., VIEIRA, F. N. 2010. Braz. J. Biol. 70 (1): 205-209.
- MATZUOKA, S. 2004. Discharge of *Edwardsiella tarda* cells from experimentally infected Japanese flounder. Fish Pathol. 39: 9-13.
- MAUEL, M. J., SOTO, E., MORALES, J. A., HAWKE, J. 2007. A piscirickettsiosis-like syndrome in cultured Nile tilapia in Latin America with *Francisella* spp. as the pathogenic agent. J. Aquatic Anim. Health. 19: 27-34.
- MC INTOSH, D., SAMOCHA, T. M., JONES, E. R., LAWRENCE, A. L., MCKEE, D. A., HOROWITZ, S., HOROWITZ, A. 2000. The effect of a bacterial supplement on the high-density culturing of *Litopenaeus vannamei* with low-protein diet in outdoor tank system and no water exchange. Aquac. Eng. 21: 215–227.
- MEYER, F. P., BULLOCK, G. L. 1973. *Edwardsiella tarda*, a new pathogen of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Appl. Microbiol. 25: 155-156.
- MINCETUR (Ministerio de Comercio Exterior y Turismo). 2000. Perfil del mercado y competitividad exportadora de la tilapia. 36 pp.
><http://www.mincetur.gob.pe/comercio/OTROS/penx/pdfs/Tilapia.pdf><
Acceso: 16/03/2015.
- MINISTRY FOR PRIMARY INDUSTRY. 2016. Aquaculture biosecurity handbook: Assisting New Zealand's commercial and non commercial aquaculture to minimise on farm biosecurity risk. Department of Agriculture, Subcommittee on Aquatic Animal Health. New Zealand. 27 pp.

><https://www.mpi.govt.nz/dmsdocument/13293/loggedIn><

Acceso: 13/05/2017.

- MIYAZAKI, T., KUBOTA, S. S., MIYASHITA, T. A. 1984. Histopathological Study of *Pseudomonas fluorescens* Infection in Tilapia. Fish pathol. 19 (3): 161-166.
- MIYAZAKI, T., KAIGE, N. 1985. Comparative histopathology of edwardsiellosis in fishes. Fish pathol. 20 (9): 219-227.
- MOHANTY, B. R., SAHOO, P. K. 2007. Edwardsiellosis in fish: a brief review; J. Biosci. 32: 1331-1344.
- MONRÁS, M., QUINTEROS, V., ENRÍQUEZ, R. 2003. Furunculosis atípica en salmonídeos de cultivo en Chile. Vetermas. 22-24.
- MONSALUD, R. G., MAYBANUA, F. O., TAPAY, L. M., HEDREYDA, C. T., OLYMPIA, M. S., MIGO, V. P., KURAHASHI, M., YOKOTA, A. 2003. Identification of pathogenic and non pathogenic Vibrio strains from shrimp farms in the Philippines. J. Gen. Appl. Microbiol. 49: 309-314.
- MORENO, M., MEDINA, L. Y., ÁLVAREZ, J., OBREGÓN, J., MEDINA, G. 2006. Detección de *Plesiomonas shigelloides* mediante la PCR en tilapias silvestres (*Oreochromis mossambicus*) y cultivadas (tetrahíbrido *O. mossambicus* × *O. urolepis hornorum* × *O. niloticus* × *O. aureus*) en Venezuela. Rev Científica, FCV-LUZ. 16 (5): 459 - 465.
- MUROGA, K., TAKAHASHI, S., YAMANOI, H. 1979. Non-cholera Vibrio isolated from diseased ayu. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 45 (7): 829-834.
- NADIRAH, M., RUHIL, H. H., JALAL, K. C., NAJIAH, M. 2012. Occurrence of *Plesiomonas shigelloides* in cultured red hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*) from tropical rivers, east coast Malaysia. Pak. J. Biol. Sci. 15 (2): 600-603.
- NAJIAH, M., LEE, S.W., LEE, K.L. 2006. Phenotypic characterization and numerical analysis of *Edwardsiella tarda* in wild asian swamp eel, *Monopterus albus* in Terengganu. J. Sustainability Science and Management. 1: 85-91.
- NAKATSUGAWA, T. 1983. *Edwardsiella tarda* isolated from cultured young flounder. Fish Pathol. 18: 99-101.

- NANTONGO, M. 2017. Molecular characterization of *Edwardsiella* species isolated from African catfish (*Clarias gariepinus*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Wakiso district, Uganda. [Tesis Magister]. Fac Agric: Sokoine University. 59.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2015. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M02-A12.
>https://clsi.org/media/1631/m02a12_sample.pdf<
Acceso: 29/03/18.
- Nicovita. 2013. Manual de crianza de tilapia. 48 pp.
><http://www.industriaacuicola.com/biblioteca/Tilapia/Manual%20de%20crianza%20de%20tilapia.pdf><
Acceso: 15/12/2017.
- NISHA, R. G., RAJATHI, V., MANIKANDAN, R., PRABHU, N. M., 2014. Isolation of *Plesiomonas shigelloides* from Infected Cichlid Fishes using 16S rRNA Characterization and its Control with Probiotic *Pseudomonas* sp. Acta Sci. Vet. 42 (1): 1-7.
- NOGUEROLA, I., BLANCH, A. 2008. Identification of *Vibrio* spp. With a set of dichotomous keys. J Appl Microbiol. 105 (1): 175-85.
- NOVOTNY, L., DVORSKA, L., LORENCOVA, A., BERAN, V., PAVLIK, I. 2004. Fish: a potential source of bacterial pathogens for human beings. Vet. Med – Czech. 49 (9): 343-358.
- OGARA, W. O., MBUTHA, P. G., KABURIA, H. F. A., SORUM, H., KAGUNYA, D. K., NDUTHU, D. I. 1998. Motile aeromonads associated with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) mortality in Kenya. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 18 (1): 7-9.
- OGDEN, I. D., MILLAR, I. G., WATT, A. J., WOOD, L. 1993. A comparison of three identification kits for the confirmation of *Aeromonas* spp. Letters in Applied microbiology. 18: 97-99.
- OH, E., SON, K. T., YU, H., LEE, T. S., SHIN, S., KWON, J. Y., PARK, K., KIM, J. 2011. Antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio*

- alginolyticus* strains isolated from farmed fish in Korea from 2005 through 2007. J. Food Prot. 74 (3): 380-6.
- ÖZTÜRK, R. C., ALTINOK, I. 2014. Bacterial and Viral Fish Diseases in Turkey. J. Fish. Aquat. Sci. 14: 275-297.
 - PANORAMA ACUÍCOLA. 2012. Líneas genéticas de tilapia y tecnologías de incubación.
<http://www.panoramaacuicola.com/articulos_y_entrevistas/2012/07/04/lineas_geneticas_de_tilapia_y_tecnologias_de_incubacion_.html>.
Acceso: 13/03/2015.
 - PARK, S., WAKABAYASHI, H., WATANABE, Y. 1983. Serotype and virulence of *Edwardsiella tarda* isolated from eel and their environment. Fish Pathology. 18: 85-89.
 - PARK, S. B., AOKI, T., JUNG, T. S. 2012. Pathogenesis of and strategies for preventing *Edwardsiella tarda* infection in fish. Vet. Res. 43: 67.
 - PAZDZIOR, W. 2016. *Shewanella putrefaciens* - a new opportunistic pathogen of freshwater fish. Vet. Res. 60: 429-434.
 - PERERA, R. P., JOHNSON, S. K., COLLINS, M. D., LEWIS, D. H. 1994. *Streptococcus iniae* associated with mortality of *Tilapia nilotica* x *T. aurea* hybrids. J. Aquatic Anim. Health. 6: 335-340.
 - PEKALA, A., KOZINSKA, A., PAZDZIOR, E., GŁOWACKA, H. 2015. Phenotypical and genotypical characterization of *Shewanella putrefaciens* strains isolated from diseased freshwater fish. J. Fish Dis. 38: 283–293.
 - PIRARAT N. 2007. Pathological Study of *Edwardsiella tarda* Infection in tilapias using immunohistochemical technique. Proceedings of the 33rd Thai Veterinary Medical Association Sofitel Centara Grand Bangkok. 1-4.
 - PLUMB, A. J., HANSON, A. L. 2011. Health Maintenance and Principal Microbial Diseases of Cultured Fishes. 3rd ed. Willey – Blackwell. Singapur. 482 pp.
 - PRODUCE (Ministerio de la Producción del Perú). 2010. Anuario estadístico del sector producción 2010. 229 pp.
 - PRODUCE (Ministerio de la Producción del Perú). 2018. Anuario estadístico pesquero y acuícola 2017. 200 pp.

- QIN, L., ZHU, M., XU, J. 2012. First report of *Shewanella* sp. and *Listonella* sp. infection in freshwater cultured loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. Aquacult. Res. 1-7.
- RAJAN, P. R., LOPEZ, C., LIN, J., YANG, H-L. 2001. *Vibrio alginolyticus* infection in cobia (*Rachycentron canadum*) cultured in Taiwan. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 21 (6): 228-234.
- RASHID, M. M., HONDA, K., NAKAI, T., MUROGA, K. 1994. An ecological study of *Edwardsiella tarda* in flounder farms. Fish Pathol. 29: 221-227.
- RAY, A. J., LEWIS, B. L., BROWDY, C. L., LEFFLER, J. W. 2010. Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. Aquaculture. 299: 89-98.
- REHULKA, J. 2002. *Aeromonas* causes severe skin lesions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Clinical Pathology, Haematology and Biochemistry. Acta Vet. Brno. 71: 351-360.
- REHULKA, J., PETRAS, P., MAREJKOVA, M., ALDOVA, E. 2015. *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 infection in fish in the Czech Republic. Vet Med-Czech. 60 (1): 16–22.
- ROBERTS, R. J., SOMMERVILLE, C. 1982. Diseases of tilapias. En: Pulin R.S.V., Lowe-McConnell R.H. (eds) The Biology and Culture of Tilapias. ICLARM Conference Proceedings N° 7. Manila, Philippines. 247-262.
- RODICIO, M., MENDOZA, M. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 22 (11): 81-87.
- SAITOU, N., NEI, M. 1987. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. Molecular Biology and Evolution. 4 (4): 406-25.
- SAEED, M. O., ALAMOUDI, M. M., HARBI, A. L. 1990. Histopathology of *Pseudomonas putrefaciens* associated with disease in cultured rabbitfish, *Siganus rivulatus* (Forsk.) J. Fish Dis. 13: 417-422.
- SAE-OUI, D., MUROGA, K., NAKAI, T. 1984. A case of *Edwardsiella tarda* infection in cultured colored carp *Cyprinus carpio*. Fish Pathol. 19:197–199.

- SAWABE, T., KITA-TSUKAMOTO, K., THOMPSON, F. L. 2007. Inferring the Evolutionary History of *Vibrios* by Means of Multilocus Sequence Analysis. *J Bacteriol.* 189 (21): 7932-7936.
- SCAAH (Sub-committee on Aquatic Animal Health). 2017. Aquaculture Farm Biosecurity Plan: Generic guidelines and template. Australia. 39 pp.
><http://www.agriculture.gov.au/SiteCollectionDocuments/fisheries/aquaculture/aquaculture-farm-biosecurity-plan.pdf><
Acceso: 13/05/2018.
- SCHACKER, T., ZEH, J., HU, H., HILL, E., COREY, L. 1998. Frequency of symptomatic and asymptomatic *Herpes simplex* virus type 2 reactivations among human immunodeficiency virus infected men. *J. Infect Dis.* 178: 1616-22.
- SHAYO, S. D., MWITA, C. J., HOSEA, K. 2012. Ulcerative *Aeromonas* infections in Tilapia (Cichlidae: Tilapiini) from Mtera hydropower dam, Tanzania. 1: 115.
- SONIA, G. A., LIPTON, A. P. 2012. Pathogenicity and antibiotic susceptibility of *Vibrio* species isolated from the captive – reared tropical marine ornamental blue damselfish, *Pomacentrus caeruleus* (Quoy and Gaimard, 1825). *Indian J. Geomarine Sci.* 41 (4): 348-354.
- SOTO, E., HAWKE, J. P., FERNÁNDEZ, D., MORALES, J. A. 2009. *Francisella* sp., an emerging pathogen of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in Costa Rica. *J. Fish Dis.* 32: 713-722.
- STARLIPER, C.E. 2008. General and specialized media routinely employed for primary isolation of bacterial pathogens of fishes. *J. Wildlife Dis.* 44 (1): 121-132.
- SUEBSING, R., KAMPEERA, J., SIRITHAMMAJAK, S., JAYAPRASAD, P. P., JITRAKORN, S., ARUNRUT, N., SANGSURIYA, P., SAKSMERPROME, V., SENAPIN, S., WITHYACHUMNARNKUL, B., KIATPATHOMCHAI, W. 2015. *Shewanella putrefaciens* in cultured tilapia detected by a new calcein-loop-mediated isothermal amplification (Ca-LAMP) method. *Dis. Aquat. Org.* 117: 133–143.
- SVETLANA, J., DOBRILA, J. D., VELJOVIC, L. J. 2003. *Citrobacter freundii* as a cause of disease in fish. *Acta veterinaria.* 5 (53): 399 – 410.

- TAMURA K., STECHER, G., PETERSON D., FILIPSKI A., KUMAR S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis. *Molecular Biology and Evolution*. 30 (12): 2725-9.
- THANIGAIVEL, S., VIJAYAKUMAR, S., GOPINATH, S., MUKHERJEE, A., CHANDRASEKARAN, N., THOMAS, J. 2015. In vivo and in vitro antimicrobial activity of *Azadirachta indica* (Lin) against *Citrobacter freundii* isolated from naturally infected Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Aquaculture*. 437: 252-255.
- TORANZO, A. E., CUTRIN, J. M., ROBERSON, B. S., NUNEZ, S., ABELL, J. M., HETRICK, F. M., BAYA. A. M. 1994. Comparison of the Taxonomy, Serology, Drug Resistance Transfer, and Virulence of *Citrobacter freundii* Strains from Mammals and Poikilothermic Hosts. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 60 (6): 1789-1797.
- UHLAND, F. C., HÉLIE, P., HIGGINS, R. 2000. Infections of *Edwardsiella tarda* among brook trout in Quebec. *J. Aquat. Anim. Health*. 12: 74–77.
- UMUNNA, A. M., FOINKFU, C. K., SHODEINDE, S. V. 2015. Evaluation of pathogenicity of motile *Aeromonas* species in African catfish. *IJFAS*. 2 (3): 93-98.
- VIGNIER, N., BARREAU, M., OLIVE, C., BAUBION, E., THE´ODOSE, R., HOCHEDÉZ, P., CABIE, A. 2013. Human Infection with *Shewanella putrefaciens* and *S. algae*: Report of 16 Cases in Martinique and Review of the Literature. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 89 (1): 151–156.
- WHO. 1999. Food safety issues associated with products from aquaculture. Technical report series 883. pp. 55.
- WOO, J. J., HYUNG, K. J., CHORESCA, C. H., PHIL, S. S., EUN, H. J, SANG, J. D., CHANG, P. S. 2011. Isolation and molecular detection of *Plesiomonas shigelloides* containing *tetA* gene from Asian arowana (*Scleropages formosus*) in a Korean aquarium. *African Journal of Microbiology Research*. 5 (28): 5019-5021.
- WOODLAND, J. 2006. Laboratory procedures manual. Bacteriology. Div. of fish hatcheries. 4 th ed. Washington, D.C. 5-12.

- YOON, G., AL-SAAD, N., AMBUALI, A. 2015. Gill histology of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* following chronic and acute exposure to ammonia. JAMS. 19 (1): 66-72.
- YOUNES, A. M., FARES, M. O., GAAFAR, A. Y., MOHAMED, L. A. 2016. Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio vulnificus* Strains from cultured *Oreochromis niloticus* around Qarun Lake, Egypt. Glob. Vet. 16 (1): 1-5.
- YU, J. H., HAN, J. J., PARK, K. S., PARK, K. H., PARK, S. W. 2009. *Edwardsiella tarda* infection in Korean catfish, *Silurus asotus*, in Korean fish farm. Aquacult. Res. 41: 19-26.
- ZARATE, M. S., GIANNICO, M., COLOMBRERO, C., SMAYEVSKY, J. 2011. Bacteriemia por *Vibrio cholerae* no-O1, no-O139 en un paciente en hemodiálisis crónica. Revista Argentina de Microbiología. 43: 81-8.
- ZHANG, X. J., YAO, D. R., YAN, B. L., BI, K. R., LIANG, L. G., QIN, G. M. 2012. Identification of *Vibrio cholerae* as a causative bacterium for an ulcer disease of cultured loach *Misgurnus anguillicaudatus* in China. Afr. J. Microbiol. Res. 6 (9): 2060-2070.
- ZMETER, C., TABAKA, H., SHARARA, A., KANJ, S. 2018. Non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* septicemia at a tertiary care center in Beirut, Lebanon; a case report and review. J. Infect. Public Health. 11 (5): 601-604.
- ZORRILLA, I., CHABRILLÓN, M., ARIJO, S., DÍAZ-ROSALES, P., MARTINEZ-MANZANARES, E., BALEBONA, M. C., MORIÑIGO, M. A. 2003. Bacteria recovered from diseased cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in southwestern Spain. Aquaculture. 218: 11 –20.
- ZOU, Y., GENG, Y., WANG, K., HUANG, X., CHEN, D., PENG, X., ZHONG, Z., CHEN, Z. 2014. *Edwardsiella tarda* infection in cultured Ya-fish, *Schizothorax prenanti*, in China. Aquaculture. 1-6.
- WEDEMEYER, G. A., MEYER, F. P., SMITH, L. 1976. Diseases of fishes. Book 5: Environmental stress and fish diseases. T.F.H. Pub., Neptune City, N.J., 192 p.
- WEISBURG, W. G., BARNS, S. M., PELLETIER, D. A., LANE, D. J. 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. J. Bacteriol. 173 (2): 697-703.

X. ANEXOS

X.1 FICHA DE HISTORIA CLÍNICA

Fecha:

Persona responsable:

Centro de cultivo:

Localidad:

Especie:

Estadio de producción afectado: pre - cría (), recria (), engorde ().

Talla: _____

Peso: _____

Manifestaciones clínicas:

Distribución: habitual (), próximo a la superficie (), en la entrada del recurso hídrico (), nadando próximo a la salida ().

Respiración: adquiriendo aire en la superficie del agua (), frecuencia respiratoria incrementada ().

Apetito: habitual (), anorexia ().

Mortalidad por día:

Signos externos:

PIEL

Coloración: normal (), melanótica (), eritematosa ().

Anomalías observadas: ampollas (), hongos (), protuberancias (), puntos blanquecinos (), zonas necróticas (), heridas superficiales (), heridas profundas (), pedúnculo normal (), pedúnculo con lesiones (), exoftalmia (), vientre incrementado de tamaño (), prolapso anal (), ano eritematoso (), con salida de sangre ().

Caracterización de la lesión y ubicación en el cuerpo: _____

Coloración y apariencia de los ojos: _____

Coloración y apariencia de la boca: _____

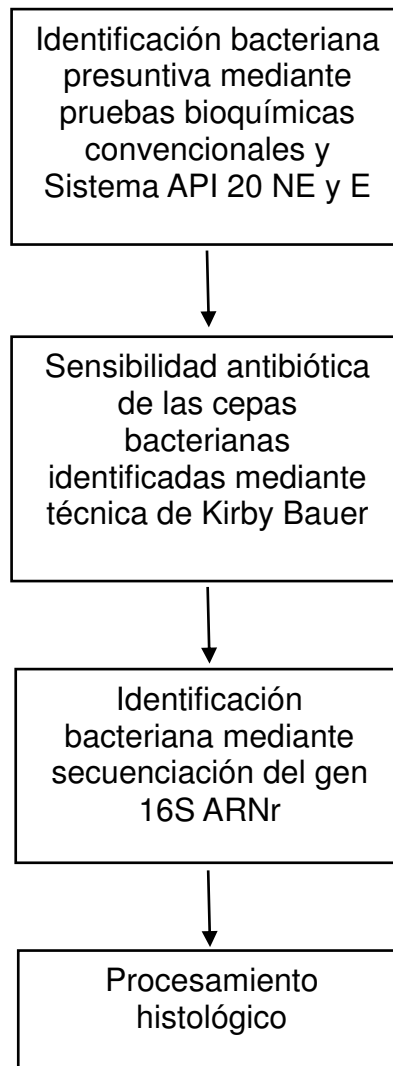
Coloración y apariencia de las branquias: _____

Otros signos: _____

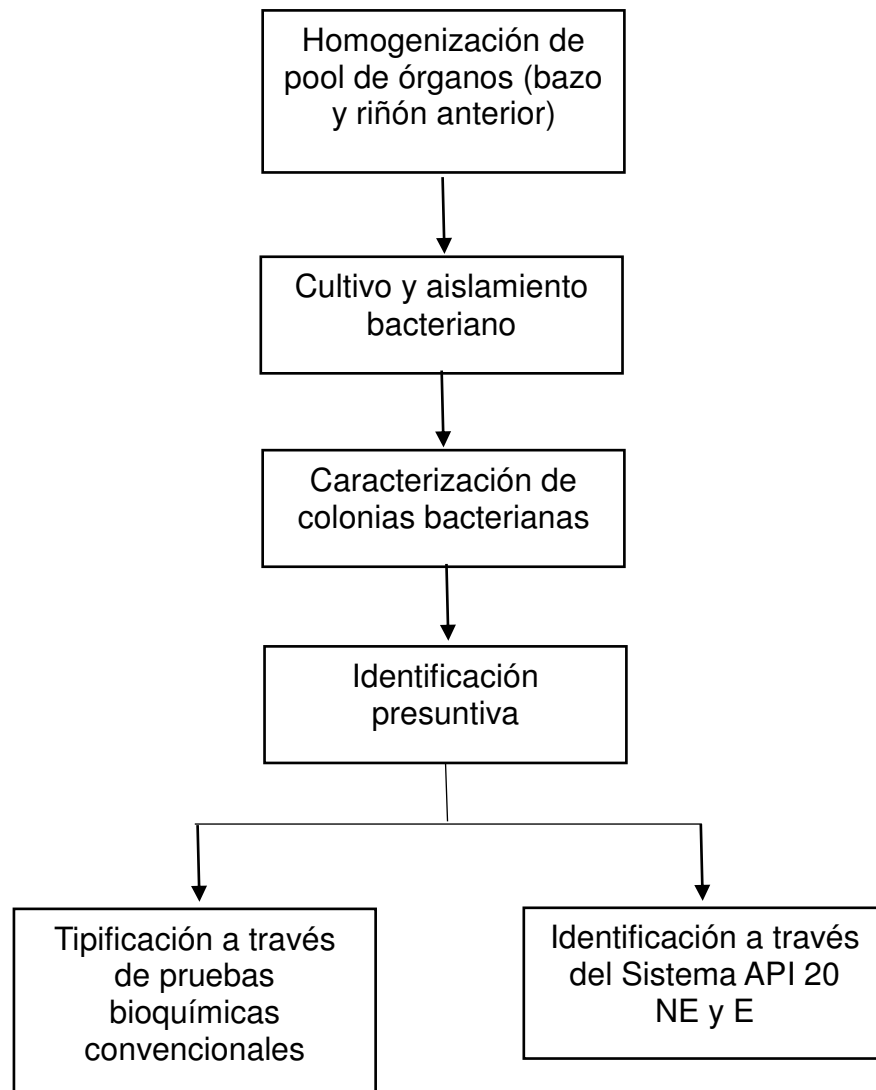
Medidas terapéuticas: droga _____

dosificación _____, tiempo de tratamiento: _____

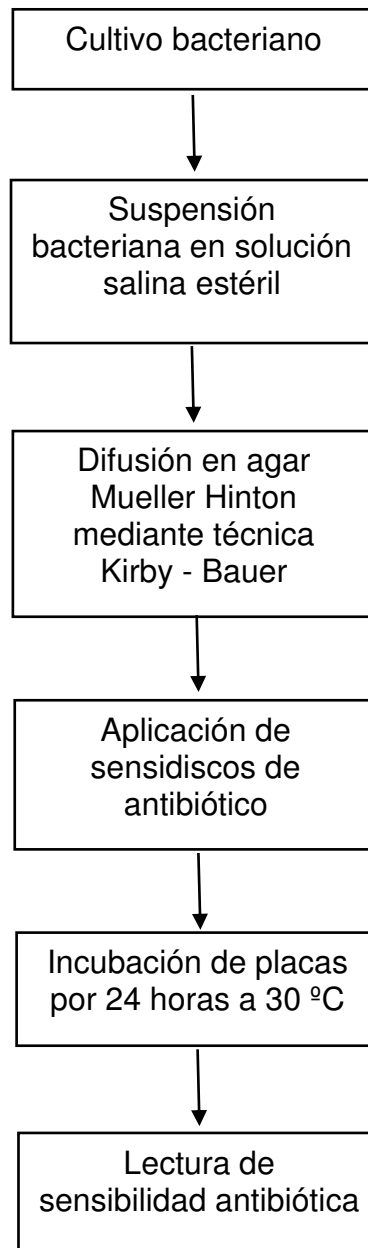
X.2 Flujograma general de procesos



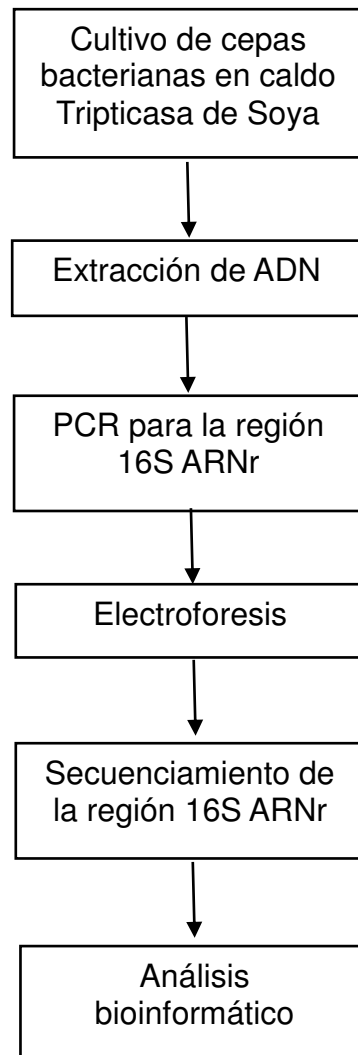
X.3 Flujograma de procedimiento para la identificación bacteriana mediante pruebas bioquímicas.



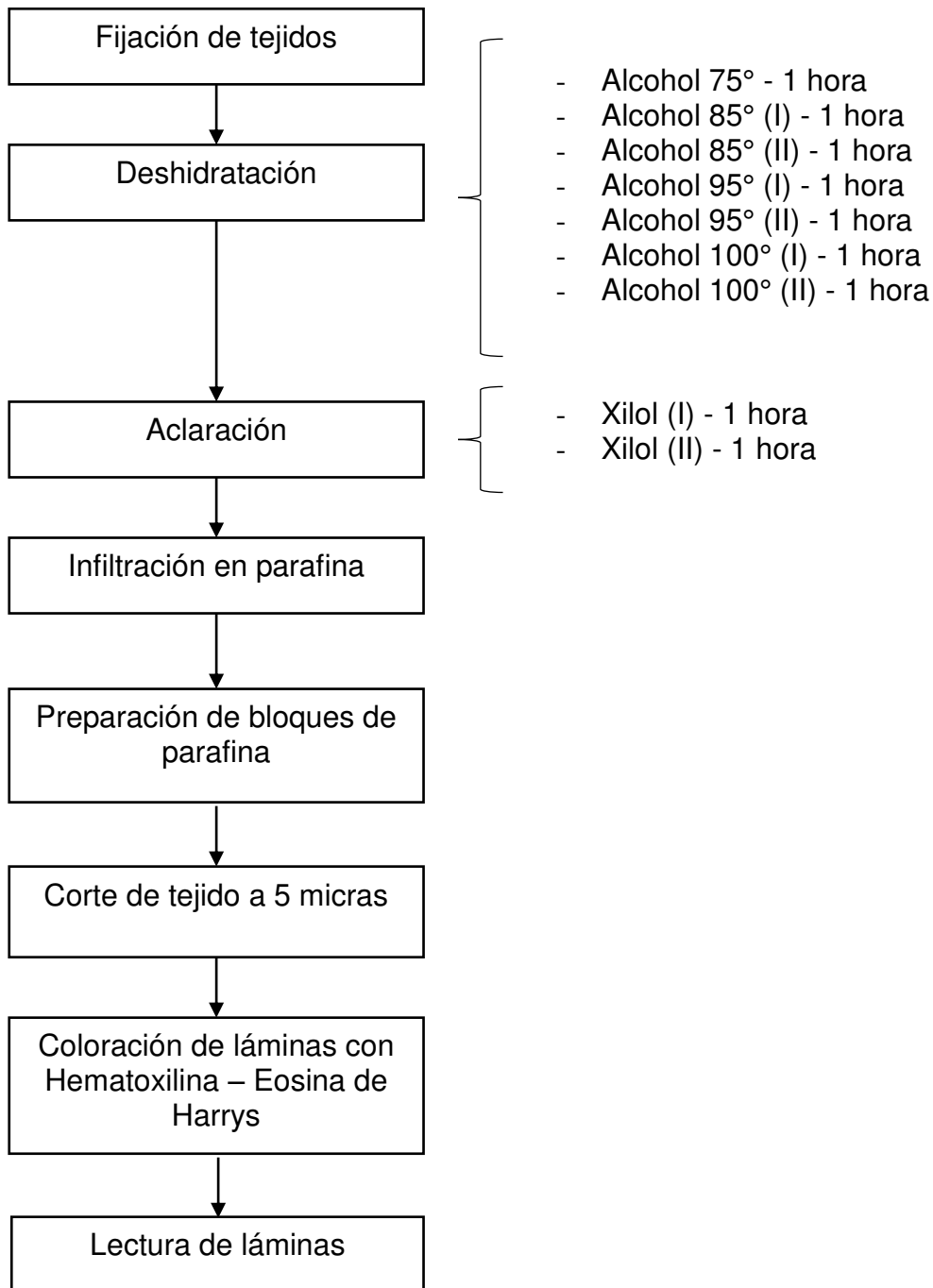
X.4 Flujograma de procedimiento para sensibilidad antibiótica.



X.5 Flujograma de procedimiento para la identificación bacteriana mediante secuenciación del gen 16S ARNr.



X.6 Flujograma de procesamiento histológico





X.7 Inclusión de bloques de tejido con parafina líquida.

**X.8 Secuencias de la región 16S ARNr de los géneros bacterianos
Edwardsiella, *Citrobacter*, *Plesiomonas*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Shewanella*
candidatos y las cepas referenciales ATCC.**

>E_tarda_1

ACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACG
GTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAA
GCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTAC
TTTCAGTAGGGAGGAAGGTGTGAACGTTAATAGCGTTCACAATTGACGTTACC
TACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGG
GTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGT
AAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAACTGCATCCAAGACTGGC
AAGCTAGAGTCTCGTAGAGGGAGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGC
GTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCTCCTGGACGAAGACT
GACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
TCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCC
GAAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAA
CTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATC
GATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGCGAATCCTGTAGAG
ATACGGGAGTGCCTTCGGGAACGCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAG
CTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTT
TGTTGCCAGCGGTTTCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGG
AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACAC
ACGTGCTACAATGGCGTATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGA
CCTCATAAAGTACGTTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAA
GTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCC

> E_tarda_2

ACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACG
GTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAA
GCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTAC
TTTCAGTAGGGAGGAAGGTGTGAACGTTAATAGCGTTCACAATTGACGTTACC
TACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGG
GTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGT
AAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAACTGCATCCAAGACTGGC
AAGCTAGAGTCTCGTAAAGGGAGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGC
GTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCTCCTGGACGAAGACT
GACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
TCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCC
GAAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAA
CTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATC
GATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGCGAATCCTGTAGAG
ATACGGGAGTGCCTTCGGGAACGCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAG
CTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTT
TGTTGCCAGCGGTTTCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGG
AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACAC
ACGTGCTACAATGGCGTATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGA

CCTCATAAAGTACGTTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAA
GT

> **E_tarda_3**

GACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGAACCCAGATGGGA
TTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCT
GAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGC
CGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGTAGGGAGGAAG
GTGTGAACGTTAATAGCGTTCACAATTGACGTTACCTACAGAAGAAGCACCGG
CTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGA
ATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTTGGATGTGAAATCC
CCCGGGCTTAACCTGGGAAGTGCATCCAAGACTGGCAAGCTAGAGTCTCGTAG
AGGGAGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAA
TACCGGTGGCGAAGGCGGCCTCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAA
GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATG
TCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGAAGCTAACGCGTTAAAT
CGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGG
GGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACC
TTACCTACTCTTGACATCCAGCGAATCCTGTAGAGATACGGGAGTGCCTTCGG
GAACGCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTT
GGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTCCGG
CGGGAAGTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGAC
GTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGT
ATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTACGTCG
TAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCT

> **E_tarda_4**

CCGAAGGTTAAGCTACCTACTTTCTTTTTGCAACCCACTCCCCATGGTGTGACG
GGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTTACCCGTGGCATTACTGATCCAC
GATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTCGCAGACTCCAATCCGGA
CTACGACGTACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTTCGCTTCTCTTTGTA
TACGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGA
CGTCATCCCCACCTTCCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGG
CCGAACCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCC
AACATTTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGCGTTC
CCGAAGGCACTCCCGTATCTCTACAGGATTTCGCTGGATGTCAAGAGTAGGTAA
GGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCC
CCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTAATCCCAGGCGGTTCGATT
TAACGCGTTAGCTTCGGAAGCCACGCCTCAAAGGGCACAACCTCCAAAATCGA
CATCGTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCT
TTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTCGTCCAGGAGGCCCGCCTTCGCCACCGGTATTC
CTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCTCCCTCTACG
AGACTCTAGCTTGCCAGTCTTGGATGCAGTTCCCAGGTTAAGCCCCGGGGATTT
CACATCCAAGTAAACAAACCGCCTGCGTGCGCTTACGCCAGTAATCCGATT
AACGCTTGCACCCTCCGATTACCAGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGC
TTCTTCTGTAGGTAACGTCAATTGTGAACGCTATTAACGTTACACCTTCCTCC
CTACTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCATACACGCGGCATGGCT

GCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAG
TCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCAGACCAGCTAGG
GATCGTCGCCTAGGTGAGCCATTACCTCACCTACTAGCTAATCCCATCTGGGTT
CATCTGATGGCATGAGGCCCGAAGGTCCCCACTTTGGTC

> E_tarda_5

CTACCTACTTTCTTTTGAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAA
GGCCCGGGAACGTATTCACCGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCC
GACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACGTACTTTATG
AGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATACGCCATTGTAGCAG
TGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCT
CCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCGAACCGCTGGCAACAA
AGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTCACAAACACGAG
CTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGCGTTCCCGAAGGCACTCCCGTAT
CTCTACAGGATTCGCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCG
AATTAAACCCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGT
TTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTTCGATTTAACGCGTTAGCTTCGGA
AGCCACGCCTCAAGGGCACAACCTCCAAATCGACATCGTTTACAGCGTGGACT
ACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTC
TTCGTCCAGGAGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTT
CACCGCTACACCTGGAATTCTACCTCCCTCTACGAGACTCTAGCTTGCCAGTCT
TGGATGCAGTTCCAGGTTAAGCCCCGGGGATTTACATCCAACCTTAACAAC
CGCCTGCGTGCGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCCGTA
TTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGTAGGTAACGTCA
ATTGTGAACGCTATTAACGTTACACCTTCCCTCCCTACTGAAAGTACTTTACAA
CCCGAAGGCCTTCTTCATACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCATT
GTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTC
CAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTAGGTGAGC
CATTACCCACCTACTAGCTAATCCCATCTGGGTTTCATCTGATGGC

> E_tarda_6

AGAGGGAGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGG
AATACCGGTGGCGAAGGCGGCCTCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGA
AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACG
ATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGAAGCTAACGCGTTA
AATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACG
GGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGA
ACCTTACCTACTCTTGACATCCAGCGAATCCTGTAGAGATACGGGAGTGCCTTC
GGGAACGCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATG
TTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTCC
GCCGGGAACCTC

>E_tarda ATCC 15947

CACCCAGTCATGAATCACAAAGTGGTAAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTAC
CTACTTCTTTTG--CA
ACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCA
CCGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTT

GCAGACTCCAATCCGGACTACGACGTACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGA
GGTCGCTTCTCTTTGTATACGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAG
GGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCAGTTTATCACTGGCAGTC
TCCTTTGAGTTCCCGGCCGAACCGCTGGCAACAAAGGATAAAGGGTTGCGCTCG
TTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGC
ACCTGTCTCAGCGTTCCCGAAGGCACTCCCGTATCTCTACAGGATTGCTGGAT
GTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCA
CCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTA
CCCCAGGCGGTTCGATTTAACGCGTTAGCTTCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCAC
AACCTCAAATCGACATCGTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGT
TTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTCGTCCAGGAGGCCGCCTT
CGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTC
TACCTCCCTCTACGAGACTCTAGCTTGCCAGTCTTGGATGCAGTTCCCAGGTTA
AGCCCGGGGATTTACATCCAACCTTAACAAACCGCCTGCGTGCGCTTTACGCC
CAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGG
AGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGTAGGTAACGTCAATTGCACGTGCTATTAACACG
CACACCTTCCTCCCTACTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCATA
CGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTCCTCCACTGCTGC
CTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCTGGTCATCCTCTC
AGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTAGGTGAGCCATTACCTCACCTACTAGCTAA
TCCCATCTGGGTTTCATCTGATGGCATGAGGCCCGAAGGTCCCCCACTTTGGTCT
TGCGACGTTATGCGGTATTAGCTACCGTTTCCAGTAGTTATCCCCCTCCATCAG
GCAGATCCCCAGACATTACTACCCGTCCGCCGCTCGTCAGCG

>C_freundii_1

CACCTTCCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTCCGAGTTCCCGTCCGAATCGC
TGGCAACAAAGGATAAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTCA
CAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCCGAAGGCA
CCAAAGCATCTCTGCTAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGC
GTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTC
ATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTA
CTCCCCAGGCGGTTCGACTTAACGCGTTA
GCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAACTCCAAGTCGACATCGTTTACGG
CGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAG
CGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCT
ACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCCT
GCCAGTTTCGGATGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCCGACTTG
ACAGACCGCCTGCGTGCGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCC
TCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGAGTA
ACGTCCATCGATGCGGGTATTAACCACAAAGCCTTCCTCCTCGCTGAAAGTAG
TTTACCACCCGAAGGGCTTCTTCTACACGCGGGATGGGTGGATCAGGCTTGC
GCCATTGTGCAATATTCCTCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGGGTC
TCAGTTCCAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCAGACCAGCTACGGATCGTCGCCTAG
GTGAGCCGTTACCCACCTACTAGCTAATCCCATCTGGGCACATCCGATGGCA
CGAGGCCCGAAGGTCCCCCGCTTTGGTCTGCGACGTTATGCGGTATTAGCTAC
CGTTTCC

>C_freundii_2

CTACCTACTTTTCTTTTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGGCGGTGTGTACA
AGGCCCGGGAACGTATTCACCGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCC
CGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACATACTTTAT
GAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATATGCCATTGTAGCAC
GTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCC
TCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCTAACCGCTGGCAACA
AAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTTACAACACGA
GCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCCGAAGGCACCAAAGCA
TCTCTGCTAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATC
GAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGT
TTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCGACTTAACGCGTTAGCTCCGGA
AGCCACGCCTCAAGGGCACAACCTCCAAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACT
ACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTC
TTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCTCCAGATCTCTACGCATTT
CACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCCTGCCAGTT
TCGGATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCCGACTTGACAGAC
CGCCTGCGTGCCTTTACGCCAGTAATTCGGATTAACGCTTGCACCCTCCGTA
TTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGAGTAACGTCA
ATTGCTGCGGTTATTAACCACAACACCTTCTCCTCGCTGAAAGTACTTTACAA
CCCGAAGGCCTTCTTCATACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCATT
GTGCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTC
CAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTAGGTGAGC
CGTTACCCACCTACTAGCTAATCCCATCTGGGCACATCCGATGGCAAGAGGC
CCGAAGGTCCCCCTTTTGGTCTTGCAGCGTTATGCGGTATTAGCTACCGTTTC
CAGTAGTTCTCCCCCTCCATCGGGCAGTTTCCCAGACATTACTACCCGTCCGC
CACTCGTCACCCAAGGAGCAAAGCTTCTTCTGTGCTACCGTT

>C_freundii ATCC 8090

GGGGCGGTTCCCTACGGTTACCTTGTTACGATTTACCCCAAGTCATGAATCACA
AAGTGGTAAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTT—CTTTTGCAA
CCCCTCCCATGGTGTGACGGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCAC
CGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTG
CAGACTCCAATCCGGACTACGACATACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAG
GTCGCTTCTCTTTGTATATGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGG
GCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCT
CCTTTGAGTTCCCGGCCGAACCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGT
TGCGGGACTTAACCCAACATTTTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCA
CCTGTCTCAGAGTTCCCGAAGGCACCAAAGCATCTCTGCTAAGTTCTCTGGATG
TCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACACATGCTCCAC
CGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTAAACCTTGCGGCCGTACTC
CCCAGGCGGTCGACTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACA
ACCTCCAAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT
TGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTC
GCCACCGGTATTCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCT
ACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCCTGCCAGTTTTCGGATGCAGTTCCAGGTTGA
GCCCGGGGATTTACATCCGACTTGACAGACCGCCTGCGTGCCTTTACGCC
AGTAATTCGGATTAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGA

GTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGAGTAACGTCAATCGCTGCGGTTATTAACCACA
ACGCCTTCTCCTCGCTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCATACAC
GCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCC
TCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCA
GACCAGCTAGGGATCGTCGCCTAGGTGAGCCGTTACCCACCTACTAGCTAAT
CCCATCTGGGCACATCCGATGGCAAGAGGCCCGAAGGTCCCCCTCTTTGGTCT
TGCGACGTTATGCGGTATTAGCTACCGTTTCCAGTAGTTATCCCCCTCCATCGG
GCAGTTTCCAGACATTACTACCCGTCCGCCACTCGTCACCCAAGGAGCAA--
GCT----CTCTGTGCTACCGTTCGACTTGC
ATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCC

>P_shigelloides_1

TGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTCA
CAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCCGAAGGCA
CCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGC
GTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTC
ATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTTCGATTTAACGCGTTA
GCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAACCTCCAAATCGACATCGTTTACAG
CGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAG
CGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCT
ACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCTT
GCCAGTTTCAAATGCAGTTCCCAAGTTGAGCTCGGGGATTCACATCTGACTTA
ACAAACCGCCTGCGTGCGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCC
TCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGAGTA
ACGTCAATGCCACTAGGTATTAAGTAGTGACCCTTCCTCCCCGCTGAAAGTGCT
TTACAACCCGAAGGCCTTCTTACACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGC
CCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCT
CAGTTCCAGTGTGACTGGTCATTCTCTCAAACCAGTTAGAGATCGTCGCCTTGG
TGAGCCATTACCTCACCAACTAGCTAATCCCACCTGGGTTTCATCCGATAGCATG
AGGTCCGAAGAGCCCCACTTTGGTCCGTAGACATTATGCGGTATTAGCTACA
GTTTCCCGTAGTTATCCCCCTCTATCGGGCAGATCCCCAGGCATTACTACCCG
TCCGCCGCTCGTCACCCAAGGAGCAAGCTCCTCTGTGTTACCGCTCGACTTGCA
TGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAG

> P_shigelloides_2

GATCCTGGTTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGC
GGTAACACAGAGGAGCTTGCTCCTTGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTA
ATGCCTGGGGATCTGCCCCGATAGAGGGGGATAACTACGGGAAACTGTAGCTAA
TACCGCATAATGTTTACGGACCAAAGTGGGGGCTCTTCGGACCTCATGCTATC
GGATGAACCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCG
ACGATCTCTAACTGGTTTGGAGAGAATGACCAGTCACACTGGAAGTGGAGACAG
GTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAA
GCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCAC
TTTCAGCGGGGAGGAAGGGTCACTAGTTAATACTAGTGGCATTGACGTTACT
CGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGG
GTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGT
AAGTCAGATGTGAAATCCCCGAGCTCAACTTGGGAACTGCATTTGAAACTGGC
AAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCG

TAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTG
ACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
CCACGCTGTAAACGATGTTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCG
GAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACT
CAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA
TGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCACAGAACTTTCCAGAGAT
GGATTGGTGCCTTCGGGA ACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCT
CGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTG
TTGCCAGCGATTCGGTCGCGAACTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAA
GAAGGTGCGGATGACGTCAACTCATCATGGCCCCTTACGAGTAGGGGTACACA
CGTGCGACAATGGCATATACTTAGGGCCCGCAAGCTTACCGAT

> P_shigelloides_3

GTCTACGGACCAAAGTGGGGGCTCTTCGGACCTCATGCTATCGGATGAACCCA
GGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCTCTAA
CTGGTTTGAGAGAATGACCAGTCACTGGA ACTGAGACACGGTCCAGACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAG
CCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGG
AGGAAGGGTCACTAGTTAATACCTAGTGGCATTGACGTTACTCGCAGAAGAAG
CACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTA
ATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTG
AAATCCCCGAGCTCAACTTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCT
TGTAGAGGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTG
GAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGT
GCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTA
AACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACG
CGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAAT
TGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCG
AAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGA ACTTTCCAGAGATGGATTGGTG
CCTTCGGGA ACTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTG
AAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCG
ATTCGGTCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGG
GGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACA
ATGGCATATACAAAGGGCGGCAAGCTAGCGATAGTGAGCGAATCCCATAAAG
TATGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCG
CTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA
CACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAGGAAAGTAGGTAG

> P_shigelloides_4

GACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACATACTTTATG
GGATTGCTCACTATCGCTAGCTTGCCGCCCTTCGTATATGCCATTGTAGCAG
TGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCT
CCGGTTTATCACCGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGACCGAATCGCTGGCAACAA
AGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTCAACAACAGAG
CTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACAGTTCCCGAAGGCACCAATCCAT
CTCTGCAGAGTTCTGTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCG
AATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTT
TTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTTCGATTTAACGCGTTAGCTCCGGAA

GCCACGCCTCAAGGGCACAACCTCCAAATCGACATCGTTTACAGCGTGGACTA
CCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCT
TTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCTCCAGATCTCTACGCATTTC
ACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCTTGCCAGTTTC
AAATGCAGTTCCCAAGTTGAGCTCGGGGATTTACATCTGACTTAACAAACCG
CCTGCGTGCGCTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCCGTATT
ACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGAGTAACGTCAA
TGCCACTAGGTATTAAGTAGTGACCCTTCCTCCCCGCTGAAAGTGCTTTACAAC
CCGAAGGCCTTCTTCACACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTG
TGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCC
AGTGTGACTGGTCATTCTCTCAAACCAGTTAGAGATCGTCGCCTTGGTGAGCCA
TTACCTCACCAACTAGCTAATCCCACCTGGGTTTCATCCGATAGCATGAGGTCCG
AAGAGCCCCCACTTTGGTCCGTAGACATTATGCGGTATTAGCTACAGTTTCCCG
TA

> ***P_shigelloides_5***

CACCTTCCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGACCGAATCGC
TGGCAACAAAGGATAAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTCA
CAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCCGAAGGCA
CCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTGTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGC
GTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTC
ATTTGAGTTTTAACCTTGCGGGCCGTACTCCCCAGGCGGTTCGATTTAACGCGTTA
GCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAACCTCCAAATCGACATCGTTTACAG
CGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAG
CGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCTCCAGATCTCT
ACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCTT
GCCAGTTTCAAATGCAGTTCCCAAGTTGAGCTCGGGGATTTACATCTGACTTA
ACAAACCGCCTGCGTGCGCTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCC
TCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGAGTA
ACGTCAATGCCACTAGGTATTAAGTAGTGACCCTTCCTCCCCGCTGAAAGTGCT
TTACAACCCGAAGGCCTTCTTCACACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCG
CCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCT
CAGTTCAGTGTGACTGGTCATTCTCTCAAACCAGTTAGAGATCGTCGCCTTGG
TGAGCCATTACCTCACCAACTAGCTAATCCCACCTGGGTTTCATCCGATAGCATG
AGGTCCGAAGAGCCCCCACTTTGGTCCGTAGACATTATGCGGTATTAGCTACA
GTTTCCCGTAGTTATCCCCCTCTATCGGGCAGATCCCCAGGCATTACTCACCCG
TCCGCCGCTCGTCACCCAAGGAGCAAGCTCCTCTGTGTTACCGCTCGACTTGCA
TGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAG

> ***P_shigelloides* ATCC 14029**

CCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTT—
CTTTTGCAACCCACTCCCATGGTGTGA
CGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATTCTGATCCGC
GATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGAC
TACGACATACTTTATGGGATTCGCTC-ACTATCGCTA-
GCTTGCCGCCCTTTGTATATG
CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTC
ATCCCCACCTTCCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGACCGA

ATCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACA
TTTCACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCCGA
AGGCACCAATCCATCTCTGGAANGTTCTGTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTT
CTTCGCGNTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGNCCCCCGT
CAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTTCGATTTAAC
GCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAACCTCCAATCGACATCGT
TTACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCA
CCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAG
ATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTC
TAGCTTGCCAGTTTTCAAATGCAGTTCCCAAGTTGAGCTCGGGGATTTACATCT
GACTTAACAAACCGCCTGCGTGCGCTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTT
GCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTG
CGAGTAACGTCAATGCCACTAGGTATTAAGTAGTGACCCTTCCTCCCCGCTGAA
AGTGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCACACACGCGGCATGGCTGCATCAGG
CTTGCGCCCATTTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACC
GTGTCTCAGTTCCAGTGTGACTGGTCATTCTCTCAAACCAGTTAGAGATCGTCG
CCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACTAGCTAATCCACCTGGGTTTCATCCGAT
AGCATGAGGTCCGAAGAGCCCCACTTTGGTCCGTAGACATTATGCGGTATTA
GCTACAGTTTCCCGTAGTTATCCCCCTCTATCGGGCAGATCCCCAGGCATTACT
CACCCGTCCGCCGCTCGTCACCCAAGGAGCAAGCTCCTCTGTGTTACCGCTCG
ACTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCATGATCAAACCTC
TTCAAT

>V_alginolyticus_1

GTAAACTACCCACTTCTTTTGCAGCCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTG
TACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGCG
ATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACGCACT
TTTTGGGATTCGCTCACTTTCGCAAGTTGGCCGCCCTCTGTATGCGCCATTGTA
GCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTTCGTCACCCAC
CTTCTCCGGTTTATCACCGGCGGTCTCCCTGGAGTTCCACCAATTACGTGCTG
GCAAACAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACA
ACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGCTCCCGAAGGCACT
CCAGCGTCTCCGCCAGATTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGT
TGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCAT
TTGAGTTTTAATCTTGCAGCCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTAACGCGTTAG
CTCCGAAAGCCACGGCTCAAGGCCACAACCTCCAAGTAGACATCGTTTACGGC
GTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCATCTGAGT
GTCAGTATCTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCTTCAGATCTCTA
CGCATTTACCGCTACACCTGAAATTCTACCCCCCTCTACAGTACTCTAGTTTG
CCAGTTTCAAATGCAATTCCAGGTTGAGCCCAGGGGCTTTCACATCTGACTTAA
CAAACCACCTGCATGCGCTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTCGCACCCCT
CCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGTAGGTAA
CGTCAAATGATAGCGCTATTAACAATACCACCTTCCTCCCTACTGAAAGTGCTT
TACAACCCGAAGGCCTTCTTCACACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGC
CCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTC
AGTTCAGTGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTTGGT
GAGCCCTTACCTACCAACTAGCTAATCCACCTGGGCATATCCTGACGCGAG
AGGCCCGAAGGTCCCCCTTTTGGCCCCGTAGGCATC

>V_alginolyticus_ATCC_17749

CGGCCCCCTACCCTAGTGGTAGCGTCCCCCGAAGGTTAAACTACCTACTTCTT
TTGCAGCCCCTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGT
ATTCACCGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTC
GAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACGCACTTTTTGGGATTCGCTCACTTT
CGCAAGTTGGCCGCCCTCTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTC
GTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGGTTTATCACCGG
CAGTCTCCCTGGAGTTCCCGACATTACTCGCTGGCAAACAAGGATAAGGGTTG
CGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAACACGAGCTGACGACAGCCA
TGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCT
CTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACAT
GCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAATCTTGCGAC
CGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTAACGCGTTAGCTCCGAAAGCCACGGCTCAA
GGCCACAACCTCCAAGTAGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTA
ATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCATCTGAGTGTGAGTATCTGTCCAGGGGG
CCGCCTTCGCCACCGGTATTCCTTCAGATCTCTACGCATTTACCCGCTACACCT
GAAATTCTACCCCCCTCTACAGTACTCTAGTCTGCCAGTTTCAAATGCAATTCC
GAGGTTGAGCCCCGGGCTTTCACATCTGACTTAACAAACCACCTGCATGCGCTT
TACGCCAGTAATTCGGATTAACGCTCGCACCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTG
GCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGTGCTAACGTCAAATAATGCAGCTATT
AACTACACTACCTTCCTCACGACTGAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTT
CACACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTTGTGCAATATTCCCCA
CTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCTGATCA
TCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCCTTACCTACCAACT
AGCTAATCCCACCTAGGCATATCCTGACGCGAGAGGCCCGAAGGTCCCCCTCT
TTGGCCCGTAGGCATCATGCGGTATTAGCCATCGTTTCCAATGGTTATCCCCCA
CATCAGGGCAATTTCTAGGCATTACTACCCGTCCGCCGCTCGACGCCGTTAT
CGTTCCCCGAAGGTTTCAGATAACTCGTTCCGCTCGACTGCATGTATAGCTAGCG
TCCTGCCC

>V_cholerae_1

GTATACGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTT
GACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCCCTGGAGTTCCC
ACCATTACGTGCTGGCAAACAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAA
CCCAACATTTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAG
CTCCCGAAGGCACTCCAGCGTCTCCGCTAGATTCTCTGGATGTCAAGAGTAGG
TAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGG
CCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAATCTTGCGACCGTACTCCCAGGCGGTCTA
CTTAACGCGTTAGCTCCGAAAGCCACGCCTCTAGGGCACAACCTCCAAGTAGA
CATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCT
TTCGCATCTGAGTGTGAGTATCTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTC
CTTCAGATCTCTACGCATTTACCCGCTACACCTGAAATTCTACCCCCCTCTACA
GTAATCTAGCTTGTGAGTTTCAAATGCGATTCTAGGTTGAGCCCAGGGCTTTC
ACATCTGACTTAACAAACCACCTGCATGCGCTTACGCCAGTAATTCGGATTA
ACGCTTGCACCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTT
CTTCTGTAGGTAACGTCAAATGATTAAGGTATTAACTTAACCACCTTCCTCCCT
ACTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCATACACGCGGCATGGCTGC
ATCAGGCTTGCGCCCATTTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTC

TGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTAGGGA
TCGTCGCCTTGGTGAGCCCTTACCTCACCAACTAGCTAATCCCACCTGGGCATA
TCCGGTAGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCCTGCTTTGCTCTTGCGAGGTTATGCG
GTATTAGCCATCGTTTCCAATGGTTATCCCCCTCTACCGGGCAATTTCCCAGGC
ATTACTCACCCGTCCGCCGCTCGCCACCCAAGGAACAAGTTCCTCTGTGCTGCC
GCTCGACTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGA

>V_cholerae_NR_044853.1

AAAGGAGGTGATCCAGCGCCAGGTTCCCCTAGCGCTACCTTGTTACGACTTCA
CCCCAGTCATGAACCACAAAGTGGCAAGCGTCCTCCCGAAGGTTAAACTACCT
GCTTCTTTTGCAGCCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCG
GGAACGTATTCACCGCAACATTCTGATTTGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCA
TGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGACTACGACGTACTTTGTGAGATTCG
CTCCACCTTCGCGGTATTCGCTGCCCTCTGTATACGCCATTGTAGCACGTGTGT
AGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGGT
TTATCACCGGCAGTCTCCCTGGAGTTCCCACCATTACGTGCTGGCAAACAAGG
ATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAACACGAGCTG
ACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGCTCCCGAAGGCACTCCAGCGTCTC
CGCTAGATTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAAT
TAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTA
ATCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTAACGCGTTAGCTCCGAAAGC
CACGCCCTAGGGGCACAACCTCCAAGTAGACATCGTTTACGGCGTGGACTACC
AGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGCATCTGAGTGTCAGTATCT
GTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCTTCAGATCTCTACGCATTTAC
CGCTACACCTGAAATTCTACCCCCCTCTACAGTACTCTAGCTTGTCAGTTTTAA
ATGCGATTCTAGGTTGAGCCCAGGGCTTTCACATCTGACTTAACAAACCACCT
GCATGCGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCCGTATTACC
GCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGTAGGTAACGTCAAATG
ATTAAGGTATTAACTTAACCACCTTCCTCCCTACTGAAAGTACTTTACAACCCG
AAGGCCTTCTTCATACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCA
ATATTCCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTG
TGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCCTTAC
CTCACCAACTAGCTAATCCCACCTGGGCATATCCGGTAGCGCAAGGCCCGAAG
GTCCCCTGCTTTGCTCTTGCGAGGTTATGCGGTATTAGCCATCGTTTCCAATGG
TTATCCCCCTCTACCGGGCAATTTCCCAGGCATTACTACCCGTCCGCCGCTCG
CCACCCAAGGAACAAGTTCCTCTGTGCTGCCGCTCGACTTGCATGTGTTAGGCC
TGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCANNATCAAACCTCT

>S_putrefaciens_1

TGATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCA
ATCCGGACTACGACGAGCTTTGTGAGATTAGTTCCACTTGGCGGTTTTGCAACC
CTCTGTATTGCGCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTATTCGTAAGGGCCATGATG
ACTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCCCTAGAGT
TCCCACCATTACGTGCTGGCAAATAAGGATAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGAC
TTAACCCAACATTTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTC
ACAGTTCCCGAAGGCACAACCGCATCTCTGCAGTCTTCTGTGGATGTCAAGAG
TAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCAACATGCTCCACCGCTTGTG
CGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCG

GTCTACTTAATGCGTTAGCTTGAGAGCCCAGTGTTC AAGACACCAA AACTCCGA
GTAGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCC
ACGCTTTCGTGCATGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGG
TATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTACCCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCT
CTACAAGACTCTAGTTCGCCAGTTCGAAATGCTATTCCTAGGTTGAGCCCAGG
GCTTTCACATCTCGCTTAACAAACCGCCTGCGCACGCTT-
ACGCCCAGTAATTCCGATTAACGCTCGGACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTG
GCACGGAGTTAGCCGGTCTTCTTCTGTAGGTAACGTACAGATGAGCCGTATT
AAGACT-CACCCTTTCCTCCCTACTGAAAGTGCT
TTACAACCCGAAGGCCTTCTTTCACACACGCGGCATGGCTGCATCAGGGTTTCC
CCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCT
CAGTCCCAGTGTGGCTGATCATCCTCTCAGAACAGCTAGGGATCGTCGCCTTG
GTGAGCCATTACCTCACCAACTAGCTAATCCCACCTAGGTTTCATCCAATCGCG
AGAGGCCCGAAGGTCCCCCTCTTCCCCCGTAGGGCGTATGCGGTATTAGCAG
TCGTTTCCA ACTGTTATCCCCCTCGACTGGGCAGATCCCTAGGCATTACTCACC
CGTCCGCCGCTCGCCACCTCA--
GGAGTAAACTCCCTTGTGCTGCCGCTCGACTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCCA
GCGTTCAATCTGAGCAG

>S_putrefaciens_ATCC_8071

GCGCCCCCCCCGAAGTTAAGCTACCCACTTCTTTTG—
CAGCCC ACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATT
CACCGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAG
TTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACGAGCTTTGTGAGATTAGCTCCACCTCGC
GGCTTTGCAACCCTCTGTACTCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTA
AGGGCCATGATGACTTGACGTCGTCCCCACCTTCCCTCCGGTTTATCACCCGGCAG
TCTCCCTAGAGTTCCACCATTACGTGCTGGCAAATAAGGATAGGGGTTGCGC
TCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGC
AGCACCTGTCTCACAGTTCCCGAAGGCACTAANCTATCTCTNGNGAGTTCTGTG
GATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCT
CCACCGCTTGTGCGG-CCCCCGTCAATTC
ATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTAATGCGTTA
GCTTGAGAGCCCAGTGTTC AAGACACCAA AACTCCGAGTAGACATCGTTTACGG
CGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGTGCATGAG
CGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCCTCCAGATCTCT
ACGCATTTACCCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGTTC
GCCAGTTCGAAATGCTATTCCTAGGTTGAGCCCAGGGCTTTCACATCTCGCTTA
ACAAACCGCCTGCGCACGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTCGGACC
CTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTCTTCTTCTGTAGGT
AACGTCACAGATATAGCGTATTAAGCTACACCCTTTCCTCCCTACTGAAAGTG
CTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTTCACACACGCGGCATGGCTGCATCAGGGTTTC
CCCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTC
TCAGTCCCAGTGTGGCTGATCATCCTCTCAGAACAGCTAGGGATCGTCGCCTTG
GTGAGCCATTACCTCACCAACTAGCTAATCCCACCTAGGTTTCATCCAATCGCG
GAAGGCCCGAAGGTCCCCCTCTTCCCCCGTAGGGCGTATGCGGTATTAGCAG
TCGTTTCCA ACTGTTATCCCCCTCGACTGGGCAGATCCCTAGGCATTACTCACC
CGTCCGCCGCTCGCCACCTCAAGGAAGTAAACTCCCTTGTGCTGCCGCTCGACT
TGCATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAA

>S_algae_1

GTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCGTCACCTTCTTCCGGTTTATCACCGG
CAGTCTCCCTAAAGTTCCCGGCATTACCCGCTGGCAAGTAAGGATAGGGGTTG
CGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAACACGAGCTGACGACAGCCA
TGCAGCACCTGTCTCACAGTTCCCGAAGGCACCAATTCATCTCTGAAAAGTTCT
GTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACAT
GCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGC
CGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTAATGCGTTAGCTTGAGAGCCCAGTGTTCAAG
ACACCAAACCTCCGAGTAGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAA
TCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGTGCCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGC
CGCCTTCGCCACCGGTATTCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTG
GAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGTTTGCCAGTTCGAAATGCGGTTCCC
AGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCTCGCTTAACAAACCGCCTGCGCACGCTTT
ACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTCGCACCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGG
CACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGAGTAACGTCACAGATGCAAGGTATT
AACTTACACCCTTTCCTCCTCGCTGAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTT
CACACACGCGGCATGGCTGCATCAGGGTTTCCCCATTGTGCAATATTCCCCAC
TGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGATCAT
CCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTAGGTGAGCCTTTACCTCACCTACTA
GCTAATCCCACCTGGGCTTATCCATCAGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCCTGCTTT
CCCCCGTAGGGCGTATGCGGTATTAGCAGTCGTTTCCA ACTGTTATCCCCACA
AATGGGCAAATTCCCAGGCATTACTACCCGTCCGCCGCTCGTCATCTTCAA
AGCAAGCTTTTGAAATGTTACCGCTCGACTTGCATGTGTTA

> S_algae_2

CAATCCGGACTACGACCAGCTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTCGCA
ACCCTCTGTA CTGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATG
ATGACTTGACGTCGTCACCTTCCCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCCCTAA
AGTTCCCGGCATTACCCGCTGGCAAGTAAGGATAGGGGTTGCGCTCGTTGCGG
GACTTAACCCAACATTTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGT
CTCACAGTTCCCGAAGGCACCGAGGCATCTCTGCCAGATTCTGTGGATGTCAA
GAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTT
GTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTA CTCCCCAG
GCGGTCTACTTAATGCGTTAGCTTGAGAGCCCAGTGTTCAAGACACCAAACCTC
CGAGTAGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTC
CCCACGCTTTCGTGCCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCAC
CGGTATTCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCC
CCTCTACAAGACTCTAGTTTGCCAGTTCGAAATGCGGTTCCCAGGTTGAGCCCC
GGGCTTTCACATCTCGCTTAACAAACCGCCTGCGCACGCTTTACGCCAGTAAT
TCCGATTAACGCTCGCACCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAG
CCGGTGCTTCTTCTGCGAGTAACGTCACAGATGTAAGGTATTA ACTTACACCCT
TTCTCCTCGCTGAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTACACACGCGGC
ATGGCTGCATCAGGGTTTCCCCATTGTGCAATATTCCC ACTGCTGCCTCCCG
TAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGATCATCTCTCAGACCA
GCTAGGGATCGTCGCCTAGGTGAGCCTTTACCTCACCTACTAGCTAATCCCACC
TGGGCTTATCCATCAGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCCTGCTTTCCCCCGTAGGG
CGTATGCGGTATTAGCAGTCGTTTCCA ACTGTTATCCCCACAAATGGGCAAAT

TCCCAGGCATTACTCACCCGTCGCGCTCGTCATCTTCAAAGCAAGCTTTTG
AAATGTTACCGCTCGACTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGA

> S_algae 3

AGCGGTAACATTTCAAAGCTTGCTTTTGAAGATGACGAGCGGCCGGACGGGTG
AGTAATGCCTGGGAATTTGCCCATTTGTGGGGGATAACAGTTGGAAACGACTG
CTAATACCGCATAACGCCCTACGGGGGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGC
TGATGGATAAGCCCAGGTGGGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAAAGGCTCACCTA
GGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGA
CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGG
GAAACCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAA
GCACTTTCAGCGAGGAGGAAAGGGTGTAAGTTAATACCTTGCATCTGTGACGT
TACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGG
AGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTT
GTTAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACCGCATTTCGAACT
GGCAA ACTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAAT
GCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAG
ACTGACGCTCAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG
TAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTCGGAGTTTGGTGTCTTGAACACTGGG
GCTCTCAAGCTAACGCATTAAGTAGACCGCCCGGGGAGTACGGCCGCAAGGT
TAAAACTCAAATGAAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
TAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCACAGAACTTTT
CAGAGATGAATTGGTGCCTTCGGGA ACTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTC
GTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCT
ATCCTTACTTGCCAGCGGGTAATGCCGGAACTTTAGGGAGACTGCCGGTGAT
AAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAG
GGCTACACACGTGCTACAATGGTCAGTACAGAGGGTTGCGAAGCCGCGAGGTG
GAGCTAATCCCATAAAGCTGGTTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACT
CCATGAAGTCGGAATCGCT

>S_algae 4

CTAATACCGCATAACGCCCTACGGGGGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGC
TGATGGATAAGCCCAGGTGGGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAAAGGCTCACCTA
GGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGA
CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGG
GAAACCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAA
GCACTTTCAGCGAGGAGGAAAGGGTGTAAGTTAATACCTTACATCTGTGACGT
TACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGG
AGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTT
GTTAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACCGCATTTCGAACT
GGCAA ACTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAA
GACTGACGCTCAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTCGGAATTTTGGTGTCTTGAACACTGG
GCTCTCAAGCTAACGCATTAAGTAGACCGCCCGGGGAGTACGGCCGCAAGGT
TAAAACTCAAATGAAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
TAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCACAGAACTTTG
GTAGAGATACATCAGTGCCTTCGGGA ACTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGT

CGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCC
TATCCTTACTTGCCAGCGGGTAATGCCGGGAACCTTTAGGGAGACTGCCGGTGA
TAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTA
GGGCTACACACGTGCTACAATGGTCAGTACAGAGGGTTGCGAAGCCGCGAGGT
GGAGCTAATCCCATAAAGCTGGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGAC
TCCATGAAGT

>S_algae 5

TCCAATCCGGACTACGACCAGCTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTCGC
AACCTCTGTACTGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCAT
GATGACTTGACGTCGTCCCCACCTTCTTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCCCTA
AAGTTCCCGGCATTACCCGCTGGCAAGTAAGGATAGGGGTTGCGCTCGTTGCG
GGACTTAACCCAACATTTCAACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTG
TCTCACAGTTCCCGAAGGCACCAATTCATCTCTGAAAAGTTCTGTGGATGTCAA
GAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTT
GTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTIONCCAG
GCGGTCTACTTAATGCGTTAGCTTGAGAGCCAGTGTTCAAGACACCAAACCTC
CGAGTAGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTC
CCCACGCTTTCGTGCCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCAC
CGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCC
CCTCTACAAGACTCTAGTTTGCCAGTTCGAAATGCGGTTCCAGGTTGAGCCCC
GGGCTTTCACATCTCGCTTAACAAACCGCCTGCGCACGCTTACGCCCAGTAATT
CCGATTAACGCTCGCACCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGC
CGGTGCTTCTTCTGCGAGTAACGTACAGATGCAAGGTATTAACCTTACACCCTT
TCCTCCTCGCTGAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCACACACGCGGCA
TGGCTGCATCAGGGTTTCCCCCATTGTGCAATATTCCCCCTGCTGCCTCCCGT
AGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCA
GCTAGGGATCGTCGCCTAGGTGAGCCTTTACCTCACCTACTAGCTAATCCCACC
TGGGCTTATCCATCAGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCCTGCTTTCCCCCGTAGGG
CGTATGCGGTATTAGCAGTCGTTTCCAACCTGTTATCCCCCACAATGGGCAAAT
TCCCAGGCATTAACCTACCCCGTCCGCGCTCGTCATCTTCAAAGCAAGCTTTTG
AAATGTTACCGCTCGACTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGA
GCAG

>S_algae 6

ACGCCCTACGGGGGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTGATGGATAAGC
CCAGGTGGGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAAAGGCTCACCTAGGCGACGATCCC
TAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC
TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATG
CAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCG
AGGAGGAAAGGGTGTAAAGTTAATACCTTGCATCTGTGACGTTACTCGCAGAAG
AAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGC
GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGTAAAGCGAGA
TGTGAAAGCCCCGGGCTAACCTGGGAACCGCATTTTCAAAGTGGCAAACCTAG
AGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT
CTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCA
GGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCC
GTAAACGATGTCTACTCGGAGTTTGGTGTCTTGAACACTGGGCTCTCAAGCTAA

CGCATTAAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTAAAACCTCAAATGA
ATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACG
CGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCACAGAACTTTTCAGAGATGAATTGGT
GCCTTCGGGAACCTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGT
GAAATGTTGGGTAAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTATCCTTACTTGCCAG
CGGGTAATGCCGGGAACCTTAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGG
TGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCT
ACAATGGTCAGTACAGAGGGTTGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATA
AAGCTGGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAA
TCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGT
ACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGCTGCACCAGAAGTAGATAG

>S_algae 7

AAGCTATCTACTTCTGGTGCAGCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTAC
AAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGCGATT
CCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACCAGCTTTA
TGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTCGCAACCCTCTGTACTGACCATTGTAGCA
CGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCGTCCCCACCTTC
CTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCCCTAAAGTTCCCGGCATTACCCGCTGGCAA
GTAAGGATAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTCACAAACAC
GAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACAGTTCCCGAAGGCACTTATG
TATCTCTGCCAAATTCTGTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCA
TCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGA
GTTTTAACCTTGCGGCCGTAATCCCCAGGGCGGTCTACTTAATGCGTTAGCTTG
AGAGCCCCAGTGTTCAAGACACCAAACCTCCGAGTAGACATCGTTTACGGCGTG
GACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGTGCCTGAGCGTC
AGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGC
ATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGTTTGCC
AGTTCGAAATGCGGTTCCAGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCTCGCTTAACA
AACCGCCTGCGCACGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTCGCACCCCTCC
GTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGAGTAAC
GTCACAGATGTAAGGTATTAACCTTACACCCTTTCCTCCTCGCTGAAAGTGCTTT
ACAACCCGAAGGCCTTCTTACACACGCGGCATGGCTGCATCAGGGTTTCCCC
CATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCA
GTCCCAGTGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTAGGT
GAGCCTTACCTACCTACTAGCTAATCCCACCTGGGCTTATCCATCAGCGCAA
GGCCCGAAGGTCCCCTGCTTCCCCCGTAGGGCGT

>S_algae ATCC 51192

GACTTCACCCCAGTCATGAACCACACCGTGGTAAACGCCCTCCCGAAGGTAA
GCTATCTACTTCTGGTG—
CAGCCCCTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATT
CACCGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAG
TTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACCAGCTTTATGGGATTAGCTC-
CACCTCGCGG-CTTCGCAACCCTCTGTACTGACCATTGTAGCACGTGTG
TAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGG
TTTATCACCGGCAGTCTCCCTAAAGTTCCCGGCATTACCCGCTGGCAAGTAAGG
ATAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTCACAAACACGAGCTG

ACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACAGTTCCCGAAGGCACCAATTCATCTC
TGAAAAGTTCTGTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAA
TAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTT
AACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTAATGCGTTAGCTT-
GAGAGCCCAGTGTTCAAGACACCAAACCTCCGAGTAGACATCGTTTACGGCGTG
GACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGTGCCTGAGCGTC
AGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGC
ATTCACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGTTTGCCA
GTTTCGAAATGCGGTTCCCAGGTTGAGCCCCGGGGCTTTCACATCTCGCTTAACAA
ACCGCCTGCGCACGCTTACGCCCAGTAATTCCGATTAACGCTCGCACCCCTCCG
TATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGAGTAACGT
CACAGATGTAAGGTATTAAC-
GCTGAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCACACACGCGGCATGGCTGC
ATCAGGGTTTCCCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTC
TGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTAGGG
ATCGTCGCCTAGGTGAGCCTTACCTCACCTACTAGCTAATCCACCTGGGCTT
ATCCATCAGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCCTGCTTTCCCCCGTAGGGCGTATGC
GGTATTAGCAGTCGTTTCCAACCTGTTATCCCCACAAATGGGCAAATTCCCAGG
CATTACTACCCGTCCGCCGCTCGTCATCTT---CAAAGC--AAGCTT—
TTGAAATGTTACCGCTCGACTTGCAATGTGTTAGGCCCTGCCGCCAGCGTTCAATC
TGAGCCATG

>A_caviae 1

AAGCTATCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTAC
AAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAACATTCTGATTTGCGATTACTAGCGATT
CCGACTTCACGGAGTCGAGTTGCAGACTCCGATCCGGACTACGACGCGCTTTTT
GGGATTCGCTCACTATCGCTAGCTTGCAGCCCTCTGTACGCGCCATTGTAGCAC
GTGTGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCC
TCCGTTTTATCACCGGCAGTCTCCCTTGAGTTCCACCATTACGTGCTGGCAAC
AAAGGACAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACG
AGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTCTGATTCCCGAAGGCACTCCCGC
ATCTCTGCAGGATTCCAGACATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCAT
CGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAG
TTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTTCGATTTAACGCGTTAGCTCCGG
AAGCCACATCTCAAGGACACAGCCTCCAAATCGACATCGTTTACGGCGTGGAC
TACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGT
CTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATT
TCACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCTGGACAGTT
TTAAATGCAATTCCCAGGTTGAGCCCCGGGGCTTTCACATCTAACTTATCCAACC
GCCTGCGTGCGCTTACGCCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCCGTAT
TACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGAGTAACGTCA
CAGCTGGCAGTTATTAGCTACCAACCTTTCCTCCTCGCTGAAAGTGCTTTACAA
CCCGAAGGCCTTCTTCACACACGCGGCATGGCTGCATCAGGGTTTCCCCATTG
TGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCC
AGTGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTTGGTGAGCC
ATTACCTCACCAACTAGCTAATCCACCTGGGTTTCATCCAATCGCGCAAGGCC
CGAAGGTCCCCTGCTTTCCCCCGTAGGGCGTATGCGGTATTAGCTACCGTTTCC
AGTAGTTATCCCCCTCGACTGGGCAGATCCCCAGGCATTACTACCCGTCCGCC
GCTCGCCGGCAAAGTAGCAAGCTAACTTTC

>A_caviae 2

TCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCGG
GAAAGTAGCTTGCTACTTTTGCCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTG
GGGATCTGCCAGTCGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCA
TACGCCCTACGGGGGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTTGCGCGATTGGATGAA
CCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCC
CTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGAT
GCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGC
GAGGAGGAAAGGTCCGTAGCTAATATCTGCCAGCTGTGACGTTACTCGCAGAA
GAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAG
CGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTGGATAAGTTAG
ATGTGAAAGCCCCGGGCTAACCTGGGAATTGCATTTAAACTGTCCAGCTAG
AGTCTTGTAGAGGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAG
ATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCT
CAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG
CCGTAAACGATGTCGATTTGGAGGCTGTGTCCTTGAGACGTGGCTTCCGGAGC
TAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAA
TGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCA
ACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCTGGAATCCTGTAGAGATACGG
GAGTGCCTTCGGGAATCAGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCGTCAGCTCGTG
TCCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTGTCCTTTGTTGC
CAGCACGTAATGGTGCCAACCTCAAGGGATACTGCCGGTGATAAACCG

>A_caviae 3

TCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGA
ACGTATTCACCGCAACATTCTGATTTGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGG
AGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACGCGCTTTTTGGGATTCGCTCA
CTATCGCTAGCTTGCAGCCCTCTGTACGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCT
GGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTATCA
CCGGCAGTCTCCCTTGAGTTCCACCATACGTGCTGGCAACAAAGGACAGGG
GTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACA
GCCATGCAGCACCTGTGTTCTGATTCCCGAAGGCACTCCCGTATCTCTACAGGA
TTCCAGACATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACC
ACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTAACTTG
CGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCGATTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGT
CTCAAGGACACAGCCTCCAAATCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGT
ATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCA
GGGGGCCGCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTA
CACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCTGGACAGTTTTAAATGCA
ATTCCCAGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCTAACTTATCCAACCGCCTGCGTG
CGCTTTACGCCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGC
TGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGAGTAACGTCACAGCCAGCA
GATATTAGCTACTGACCTTTCCTCCTCGCTGAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGC
CTTCTTCACACACGCGGCATGGCTGCATCAGGGTTTCCCCCATTGTGCAATATT
CCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCT
GATCATCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCTCAC

CAACCAGCTAATCCCACCTGGGCATATCCAATCGCGCAAGGCCCGAAGGTCCC
CTGCTTTCCCCCGTAGGGCGT

>A_caviae_4

TAGCTTGCAGCCCTCTGTACGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGTA
AGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTTCCGGTTTATCACCCGGCAG
TCTCCCTTGAGTTCCCACCATTACGTGCTGGCAACAAAGGACAGGGGTTGCGC
TCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGC
AGCACCTGTGTTCTGATTCCCGAAGGCACTCCCGTATCTCTACAGGATTCCAGA
CATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCACATGCT
CCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGT
ACTCCCCAGGCGGTTCGATTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGTCTCAAGGA
CACAGCCTCAAATCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATC
CTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCG
CCTTCGCCACCGGTATTCCCTCCAGATCTCTACGCATTTACCAGCTACACCTGGA
ATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCTGGACAGTTTTAAATGCAATTCCCAG
GTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCTAACTTATCCAACCGCCTGCGTGCGCTTTAC
GCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCAGCGGCTGCTGGCA
CGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGAGTAACGTCACAGCCAGCAGATATTAG
CTACTGACCTTTCCTCCTCGCTGAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCA
CACACGCGGCATGGCTGCATCAGGGTTTCCCCCATTGTGCAATATTCCCCTG
CTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCTGATCATCC
TCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACCAG
CTAATCCCACCTGGGCATATCCAATCGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCCTGCTTT
CCCCCGTAGGGCGTATGCGGTATTAGCAGTCGTTTCCAAGTATTCCCCCTCG
ACTGGGCAATTTCCCAGGCATTACTACCCGTCCGCCGCTCGCCGGCAAAG--
TA-GC---AAGCTA-CTTTCCCGCTGCCGC
TCGACTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGA

>A_caviae_5

GCTATCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAA
GGCCCGGGAACGTATTCACCCGAACATTCTGATTTGCGATTACTAGCGATTCCG
ACTTCACGGAGTCGAGTTGCAGACTCCGATCCGGACTACGACGCGCTTTTTGG
GATTCGCTCACTATCGCTAGCTTGCAGCCCTCTGTACGCGCCATTGTAGCACGT
GTGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTC
CGGTTTATCACCGGCAGTCTCCCTTGAGTTCCCACCATTACGTGCTGGCAACAA
AGGACAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAG
CTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTCTGATTCCCGAAGGCACTCCCGTAT
CTCTACAGGATTCCAGACATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATC
GAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGT
TTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTTCGATTTAACGCGTTAGCTCCGGA
AGCCACGTCTCAAGGACACAGCCTCAAATCGACATCGTTTACGGCGTGGACT
ACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTC
TTTGTCCAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGTATTCCCTCCAGATCTCTACGCATTT
CACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCTGGACAGTTT
TAAATGCAATTTCCAGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCTAACTTATCCAACCG
CCTGCGTGCGCTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCCGTATT
ACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGAGTAACGTAC

AGCTGTCGGATATTAGCCAACAACCTTTCCTCCTCGCTGAAAGTGCTTTACAAC
CCGAAGGCCTTCTTCACACACGCGGCATGGCTGCATCAGGGTTTCCCCATTGT
GCAATATTTCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCA
GTGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCAT
TACCTCACCAACTAGCTAATCCCACCTGGGCATATCCAATCGCGCAAGGCCCG
AAGGTCCCCTGCTTTCCCCCGTAGGGCGTATGCGGTATTAGCAGTCGTTTCCAA
CTGTTATCCCCCTCGACTGGGCAAATTCCCAGGCATTACTACCCGTCCGCCGC
TCGCCGGCAAAAA-GTA-GC—AAAGC
TAACTTTCCCGCTGCCGCTCGAACTGCA

>A_caviae_ATCC_15468

CCCTCCCGAAGGTTAAGCTATCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGA
CGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAACATTCTGATTTGC
GATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGAC
TACGACGCGCTTTTTGGGATTCGCTCACTATCGCTAGCTTGCAGCCCTCTGTAC
GCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGAC
GTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCCCTTGAGTTCCCACC
ATTACGTGCTGGCAACAAAGGACAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCC
AACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTCTGATTC
CCGAAGGCACTCCCGNATCTCTNCAGGATTCCAGACATGTCAAGGCCAGGTAA
GGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCC
CCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTTCGATT
TAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGTCTCAAGGACACAGCCTCCAAATCGACA
TCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTT
CGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCT
CCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAG
ACTCTAGCTGGACAGTTTTAAATGCAATTCCAGGTTGAGCCCAGGGGCTTTCAC
ATCTAACTTATCCAACCGCCTGCGTGCCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAAC
GCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCT
TCTGCGAGTAACGTCACAGCAGCAGATATTAGCTACTGACCTTTCCTCCTCGCT
GAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCACACACGCGGCATGGCTGCATC
AGGGTTTCCCCATTGTGCAATATTTCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGG
ACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCG
TCGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACTAGCTAATCCCACCTGGGCATATCC
AATCGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCCTGCTTTCCCCCGTAGGGCGTATGCGGTA
TTAGCAGTCGTTTCCAACCTGTTATCCCCCTCGACTGGGCAATTTCCCAGGCATT
ACTACCCGTCCGCCGCTCGCCGGCAAAA--GTA-GC—AAG—
CTACTTTCCCGCTGCCGCTCGACTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCA
ATCTGAGCCATGATCAAACCTCTTCAAT

>S_agalactiae ATCC 13813

CTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTAGAACGCTGAGGTTTGGTGTTTACAC
TAGACTGATGAGTTGCGAACGGGTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTCATAG
CGGGGGATAACTATTGGAAACGATAGCTAATACCGCATAAGAGTAATTAACAC
ATGTTAGTTATTTAAAAGGAGCAATTGCTTCACTGTGAGATGGACCTGCGTTGT
ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATACATAGCCGACC
TGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGGAAGTCTGACCGAGCAACG

CCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAAGAA
CGTTGGTAGGAGTGGAAAATCTACCAAGTGACGGTAACTAACCAGAAAGGGA
CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCC
GGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTCTTTAAGTCTGAAGTTAAA
GGCAGTGGCTTAACCATTGTACGCTTTGGAAACTGGAGGACTTGAGTGCAGAA
GGGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGA
ACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAA
GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATG
AGTGCTAGGTGTTAGGCCCTTTCCGGGGCTTAGTGCCGCAGCTAACGCATTAA
GCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACG
GGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGA
ACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTCTGACCGGCCTAGAGATAGGCTTTCTCTC
GGAGCAGAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATG
TTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTGTTAGTTGCCATCATTAAAG
TTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGTAATAAACC GGAGGAAGGTGGGGATGA
CGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTG
GTACAACGAGTCGCAAGCCGGTGACGGCAAGCTAATCTCTTAAAGCCAATCTC
AGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT
CGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC
GTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGA
GCCAGCCGCCTAAGGTGGGATAGATGATTGGGGTGAG

X9. Cromatogramas de cepa *Plesiomonas shigelloides*.

File: A_518F.ab1 Run Ended: 2017/2/4 0:17:16 Signal C:963 A:2768 C:2922 T:3096
 Sample: A_518F Lane: 4 Base spacing: 16.494097 2100 bases in 24059 scans Page 1 of 2



File: A_800R.ab1 Run Ended: 2017/2/4 0:17:16 Signal C:1126 A:1989 C:4373 T:3364
 Sample: A_800R Lane: 2 Base spacing: 16.902843 1263 bases in 15517 scans Page 1 of 2



X.10 GLOSARIO

- **ANEURISMA:** También llamada telangiectasia, es la dilatación crónica de pequeños vasos sanguíneos en las lamelas branquiales secundarias.
- **ANOREXIA:** Reducción del apetito que conlleva a que el individuo ingiera menor cantidad de alimentos.
- **ASCITIS:** Almacenamiento de líquido en la cavidad visceral.
- **ATROFIA:** Disminución del tamaño de la célula.
- **BIOFILM BACTERIANO:** Son células bacterianas incrustadas en un matriz polimérica fabricada por ellas mismas y adheridas a la superficie. Dichas bacterias pueden adherirse a células, tejidos y sobre superficies sólidas.
- **CÉLULAS MONONUCLEARES:** Son células que poseen un solo núcleo y se encuentran en la sangre.
- **CONGESTIÓN:** Es el exceso de sangre en el interior de los vasos sanguíneos.
- **DEGENERACIÓN HIDRÓPICA:** También llamada degeneración vacuolar, es la vacuolización que se genera por alteraciones metabólicas, hipoxicas o colestasis, favoreciendo la entrada al citoplasma de agua e iones de sodio que expanden compartimientos celulares.
- **EDEMA:** Es la acumulación de excesiva cantidad de agua en células, tejidos o cavidades serosas.
- **EMACIACIÓN:** Adelgazamiento patológico y exagerado debido a una enfermedad o falta de alimentación.
- **EPIZOOTIA:** Entidad patológica que involucra a gran cantidad de animales en un período temporal y se disemina con significativa rapidez.
- **ESPLENOCITO:** Son los diferentes tipos de glóbulos blancos que están situados en el bazo y consisten en una variedad de población celular como linfocitos T y B, células dendríticas y macrófagos.
- **ESPLENOMAGALIA:** Es el aumento patológico del tamaño del bazo.
- **EXOFTALMIA:** Prominencia exagerada del globo ocular que puede ser síntoma de una enfermedad infecciosa.

- **FOMITE:** Es cualquier objeto o material inerte y sin vida que es capaz de transportar organismos patógenos (bacterias, hongos, virus y parásitos) como por ejemplo: botas, guantes, etc.
- **GRANULOMA:** Es una inflamación nodular localizada, la cual se forma cuando el sistema inmunológico intenta aislar sustancias extrañas como: organismos infecciosos (bacterias y hongos), irritantes químicos y físicos.
- **HEPATOMEGALIA:** Es el aumento patológico del tamaño del hígado.
- **HEMORRAGIA:** Fenómeno mediante el cual una persona o un animal sufre la pérdida de sangre de manera excesiva y fuera de lo normal.
- **HIDRONEFRÓISIS:** Es la dilatación de la pelvis y los cálices renales debido a la dificultad para la eliminación de orina.
- **HIPEREMIA:** Denominada también congestión, es el estado en el que hay exceso de sangre en el interior de los vasos sanguíneos, por dilatación y repleción de arterias, venas y capilares.
- **HIPERPLASIA:** Es el incremento en la cantidad de células de un determinado tejido u órgano.
- **LETARGIA:** Estado de somnolencia o estupor profundo.
- **MACRÓFAGO:** Son células sanguíneas de la serie blanca que se encargan de englobar partículas y elementos fornes, propiedad denominada fagocitosis.
- **MELANÓISIS:** Incremento anómalo de pigmentación tisular por acumulación de melanina.
- **NECROSIS:** Es la muerte celular en un organismo vivo.
- **PETEQUIAS:** Son lesiones hemorragicas pequeñas puntiformes.
- **PICNÓISIS:** Disminución del tamaño del núcleo celular con apariencia densa.
- **PREBIÓTICOS:** Son ingredientes alimentarios no digeribles que llegan al colon y sirven de sustrato a los microorganismos, originando energía, metabolitos y micronutrientes utilizados por el hospedador.
- **PROBIÓTICOS:** Son microorganismos vivos (bacterias y levaduras) que se encuentran en la flora intestinal, ofreciendo beneficios al cuerpo, ya que ayudan a la defensa inmunitaria y favorecen la digestión.

- **PROLAPSO:** Desplazamiento de un órgano o estructura fuera de su posición normal.
- **SEPTICEMIA:** Respuesta generalizada del organismo de un individuo frente a una infección.
- **SINTOMÁTICO:** Relativo o perteneciente al síntoma.
- **SWARMING:** Es un fenómeno que se manifiesta por la presencia de una película fina de crecimiento expansivo a partir de colonias bacterianas.