

**CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y PATOBIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN
EXPERIMENTAL CON *Edwardsiella tarda* Y *Edwardsiella anguillarum* EN
ALEVINOS DE TILAPIA (*Oreochromis* sp.)**

JAIME ALBERTO HERNÁNDEZ CARRASCAL

MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA TROPICAL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL TRÓPICO - IIBT
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Montería - Colombia

2020

**CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y PATOBIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN
EXPERIMENTAL CON *Edwardsiella tarda* Y *Edwardsiella anguillarum* EN
ALEVINOS DE TILAPIA (*Oreochromis sp.*)**

JAIME ALBERTO HERNÁNDEZ CARRASCAL

Trabajo presentado para optar al título de Magíster en Microbiología Tropical

PAOLA ANDREA BARATO GÓMEZ. PhD

Directora

RICARDO JAVIER PIÑEROS DUQUE. MSc

Codirector

Línea de Investigación

SANIDAD ACUÍCOLA

MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA TROPICAL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL TRÓPICO - IIBT
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Montería - Colombia

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUCCIÓN	11
2. ESTADO DEL ARTE	13
2.1 Acuicultura y el impacto económico de las enfermedades	13
2.2 Edwardsielosis como enfermedad en peces y otras especies	15
2.3 Coinfecciones con Edwardsielosis en peces	16
2.4 Edwardsielosis en la Interfaz animal-humano.....	16
2.5 Edwardsielosis en la interfaz ambiente – animal	19
2.6 Huéspedes, reservorios y vehículos.....	20
2.7 Piscicultura y el impacto económico de edwardsielosis	21
3. OBJETIVOS	22
3.1 General	22
3.2 Específicos.....	22
4 METODOLOGÍA	23
4.1 Tiempo y área del estudio	23
4.2 Tipo de estudio	23
4.3 Criterios de selección de los peces.	23
4.4 Obtención, recepción de los animales experimentales (larvas) y evaluación de su estatus sanitario	23
4.5 Bacterias de estudio.....	24
4.6 Modelo de infección <i>in vivo</i> con <i>E. tarda</i> y <i>E. anguillarum</i> por inmersión (INM), inoculación intragástrica (IG) e intraperitoneal (IP) en alevinos de tilapia de 3 a 5 cm de talla y 3 a 5 gr de peso en promedio (Reed, 1938).	26
4.7. Evaluación clínica, necropsia y pesaje de animales experimentales	28
4.8 Análisis estadístico	30
5. RESULTADOS	31

5.1 Animales experimentales.....	31
5.2 Cuantificación de <i>Edwardsiella tarda</i> (18-294) y <i>Edwardsiella anguillarum</i> (18-355) para inoculación experimental <i>in vivo</i>	31
5.3 Replicación experimental de edwardsielosis por <i>Edwardsiella anguillarum</i> en alevinos de tilapia.....	33
5.4 Replicación experimental de edwardsielosis por <i>Edwardsiella tarda</i> en alevinos de tilapia.....	35
5.5 Reducción de ganancia de peso al final del ensayo (30 días PI) en los peces inoculados con <i>E. anguillarum</i> y <i>E. tarda</i> tanto por vía IG y INM	36
6 DISCUSIÓN	38
7 CONCLUSIONES.....	45
8 RECOMENDACIONES.....	46
9 BIBLIOGRAFÍA.....	47
10 ANEXOS.....	58

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Grupos experimentales para inoculación in vivo de <i>E. tarda</i> y <i>E. anguillarum</i>	28
Tabla 2. Dosis de inóculos utilizados en los ensayos de inoculación Intraperitoneal (IP), intragástrica (IG) e inmersión (INM) de <i>E. tarda</i> y <i>E. anguillarum</i> en alevinos de tilapia (<i>Oreochromis</i> sp.)	32

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Cultivo de *E. tarda* y *E. anguillarum* en medio selectivo agar MacConkey. (Fotos P. Barato., R. Piñeros., J. Hernández).....25
- Figura 2. Crecimiento de colonias de *Edwardsiella anguillarum* en agar Mac Conkey al cultivo de 100ul del inóculo en la dilución 10^{-3} para confirmar la dosis final de inoculación por recuento de ufc/ml. (Fotos P. Barato., R. Piñeros., J. Hernández).....26
- Figura 3. Acuarios del área experimental con 10 peces cada uno para ensayos de infección in vivo. (Fotos P. Barato., R. Piñeros., J. Hernández).....26
- Figura 4. Modelo de infección in vivo para inoculación vía intragástrica, por inmersión e intraperitoneal y periodos de experimentación de cada modelo.29
- Figura 5. Crecimiento (UFC/ml) de *Edwardsiella tarda* y *Edwardsiella anguillarum*...32
- Figura 6. Mortalidad acumulada del día 1 al 15 postinoculación (PI) vía intraperitoneal (IP), intragástrica (IG) y por inmersión (INM) de *E. tarda* y *E. anguillarum* en alevinos de tilapia. Los peces inoculados con *E. tarda* vía IG e INM no presentaron mortalidad a los 15 días PI. Día 7 postinoculación; Porcentaje mortalidad acumulada 50%.....34
- Figura 7. Lesiones macroscópicas de tilapias inoculadas con *E. anguillarum*. A. Alevino de tilapia control negativo por inmersión a los 30 días PI; intestino con contenido, hígado color café con morfología normal. B. Alevino de tilapia inoculado IP con 10^7 ufc/ml a los 7 días PI; se observa esplenomegalia con múltiples nódulos blanquecinos puntiformes distribuidas al azar (flechas), vesícula biliar pletórica, hígado pálido e intestino sin contenido. C. Alevino de tilapia inoculado INM con 10^8 ufc/ml a los 7 días PI; se observa hepatomegalia con múltiples masas blanquecinas distribuidas al azar (flechas). (Fotos P. Barato., R. Piñeros., J. Hernández).....34
- Figura 8. Lesiones macroscópicas de tilapias inoculadas con *E. tarda*. A. Alevino de tilapia inoculado vía IP con 10^7 ufc/ml a los 15 días PI; hepatomegalia, esplenomegalia e intestino sin contenido. B. Alevino de tilapia inoculado por INM con 10^8 ufc/ml a los 30 días PI; se observa hepatomegalia, hígado pálido e intestino sin contenido. C. Alevinos de tilapia inoculados INM con 10^8 ufc/ml a los 30 días PI; se observa disparidad en las tallas. (Fotos P. Barato., R. Piñeros., J. Hernández).36

Figura 9. Peso de alevinos a día 0, 15 y 30 PI de *E. anguillarum* por vía IG e INM (*P<0,0001).....37

Figura 10. Peso de alevinos a día 0, 15 y 30 PI de *E. tarda* por vía IG e INM (*P<0,0001; **<P0,05).....37

ANEXOS

Anexo 1. RT-PCR para el segmento 3 del Virus de la Tilapia del Lago – TiLV – CM-19- 0261 – Carril 261 de larvas al momento de la llegada para evaluación de su estado sanitario.	58
Anexo 2. PCR convencional para detección del gen <i>gyrB</i> de <i>E. tarda</i> CM-19- 0262 – Carril 262 de larvas al momento de la llegada para evaluación de su estado sanitario. ..	59
Anexo 3. PCR convencional para detección del gen <i>gyrB</i> de <i>E. anguillarum</i> – CM-19-0343 - Carril 60 de larvas al momento de la llegada para evaluación de su estado sanitario.	60

RESUMEN

La edwardsielosis es una enfermedad granulomatosa sistémica que afecta un amplio rango de hospederos terrestres y acuáticos, entre ellos la tilapia (*Oreochromis* sp.). Recientemente se diferenció filogenéticamente *Edwardsiella tarda* en tres especies: *E. tarda*, *E. anguillarum* y *E. piscicida*. El propósito de esta investigación fue caracterizar clínica y patobiológicamente la infección experimental con *E. tarda* y *E. anguillarum* en alevinos de tilapia. Se realizó un estudio de tipo experimental con 19 grupos, cada uno con dos replicas, así: inóculo por inmersión (INM) e intragástrico (IG) en dosis 10^6 , 10^7 y 10^8 ufc/ml para cada bacteria (*E. anguillarum* y *E. tarda*) (12 grupos), inóculo intraperitoneal (IP) en dosis 10^6 y 10^7 ufc/ml igualmente para ambos microorganismos (4 grupos) y tres (3) grupos controles negativos con inoculación de solución salina fisiológica estéril (SSF) por las respectivas vías de inoculación (IP, IG, o IMM). Durante el periodo experimental (30 días) los peces fueron evaluados clínicamente (signos y lesiones macroscópicas). Se pesaron los alevinos en tres momentos: al día 0 inicio del experimento, al día 15 (primera fase) y al día 30 culminación del experimento (segunda fase). Los peces inoculados con *E. anguillarum* (18-355) y con *E. tarda* (18-294) por vía IP después del día 4PI y 7PI presentaron ascitis, masas blanquecinas en peritoneo y bazo, hepatomegalia, esplenomegalia, ausencia de alimento en el intestino y distensión de la vesícula biliar. Por la vía IG con *E. anguillarum* el 25% de mortalidad se presentó con 10^6 ufc/ml, el 33% con 10^7 ufc/ml y el 58% con 10^8 ufc/ml; con esta misma bacteria por vía INM con 10^6 ufc/ml no se presentó mortalidad durante los primeros 15 días de estudio, con 10^7 ufc/ml fue del 50% y con 10^8 ufc/ml del 55%. Con *E. tarda* por inoculación vía IG e INM durante un periodo de 1 a 15 días PI no hubo mortalidad y durante los días 15 al 30 PI los peces inoculados por INM con 10^8 ufc/ml tuvieron el 43% de mortalidad. Al día 30 PI se observaron diferencias significativas ($P < 0,0001$) en el peso entre el grupo control y los sobrevivientes inoculados con *E. anguillarum* y *E. tarda*. *E. anguillarum* es una bacteria más patógena en comparación con *E. tarda*, presentando la primera signos, mortalidad y lesiones más temprano y con mayor extensión y severidad por las diferentes vías de inoculación. Edwardsielosis tanto por *E. tarda* como por *E. anguillarum* es una enfermedad de carácter crónico afectando los parámetros productivos del sistema evidentes con la mortalidad y la reducción en la ganancia de peso. Este trabajo demuestra que la edwardsielosis tiene impacto directo en la productividad de la granja, por lo que se recomienda establecer su vigilancia y seguimiento para evitar altas pérdidas económicas.

Palabras claves: Edwardsielosis, *Oreochromis* sp, patobiología, parámetros productivos, granulomas.

ABSTRACT

Edwardsiellosis is a systemic granulomatous disease that affects a wide range of terrestrial and aquatic hosts, including tilapia (*Oreochromis* sp). Recently, *Edwardsiella tarda* was phylogenetically reclassified in three species: *E. tarda*, *E. anguillarum* and *E. piscicida*. The purpose of this research was to characterize clinically and pathobiologically the experimental infection with *E. tarda* and *E. anguillarum* in tilapia fingerlings. An experimental study was carried out with 19 groups, each with two replications, as follows: immersion inoculum (INM) and intragastric (IG) in doses 10^6 , 10^7 and 10^8 cfu/ml for each bacteria (*E. anguillarum* and *E. tarda*) (12 groups), intraperitoneal inoculum (IP) at doses 10^6 and 10^7 cfu/ml equally for both microorganisms (4 groups), and three (3) negative control groups with inoculation of sterile physiological buffered solution (PBS) by the respective routes inoculation (IP, IG, or IMM). During the experimental period (30 days) the fish were clinically evaluated (signs and gross lesions). The fingerlings were weighed at three times: at day 0 start of the experiment, at day 15 (first phase) and at day 30, culmination of the experiment (second phase). The fish inoculated with *E. anguillarum* (18-355) and with *E. tarda* (18-294) by IP route after day 4PI and 7PI presented ascites, whitish masses in the peritoneum and spleen, hepatomegaly, splenomegaly, absence of food in the intestine and gallbladder distention. By the IG route with *E. anguillarum*, 25% of mortality was presented with 10^6 cfu/ml, 33% with 10^7 cfu/ml and 58% with 10^8 cfu/ml; with this same bacterium by the INM route with 10^6 cfu/ml there was no mortality during the first 15 days, with 10^7 cfu/ml it was 50% and with 10^8 cfu/ml it was 55%. With *E. tarda* by inoculation via IG and INM for a period of 1 to 15 days PI there was no mortality, and during days 15 to 30 PI the fish inoculated by INM with 10^8 cfu/ml had 43% mortality. At day 30 PI, significant differences ($P < 0.0001$) in weight were observed between the control group and the survivors inoculated with *E. anguillarum* and *E. tarda*. *E. anguillarum* is a more pathogenic compared to *E. tarda*, presenting signs, mortality and gross lesions earlier and with greater extension and severity by the different routes of inoculation. Edwardsiellosis by both *E. tarda* and *E. anguillarum* is a chronic disease affecting the productive parameters of the system evident with mortality and reduction in weight gain. This work shows that edwardsiellosis has a direct impact on the productivity of the farm, so it is recommended to establish its surveillance and monitoring to avoid high economic losses.

Key words: Edwardsiellosis, *Oreochromis* sp, pathobiology, productive parameters, clinical signs.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad según datos de la FAO para el año 2016 en producción acuícola continental, la especie que más se produce a nivel mundial es la carpa (29%) (*Ctenopharyngodon idellus* 11%, *Hypophthalmichthys molitrix* 10%, *Cyprinus carpio* 8%), seguido de la tilapia (10%) (*Oreochromis niloticus* 8%, *Oreochromis* (Tilapia) sp., 2%). (FAO, 2018). Colombia ha tenido un crecimiento de la acuicultura en diferentes regiones trayendo desarrollo económico y social, que en parte se debe a la riqueza de recursos hídricos para la producción de peces y crustáceos (Parrado, 2012). Actualmente, la tilapia colombiana se sigue abriendo paso en mercados internacionales: tras conquistar el de Estados Unidos, además se convertirá en el primer producto no tradicional de la canasta agroexportadora de Colombia en llegar a Islandia (SIOC, 2020).

Lo anterior deja ver el crecimiento y la intensificación de la producción de esta especie, lo cual ha generado la presentación de enfermedades de tipo bacteriano y viral como la infección por el Virus de la Tilapia del Lago (TiLV) y bacterianas como Estreptococosis por *Streptococcus agalactiae*, Aeromoniasis por *Aeromonas hydrophila*, Flavobacteriosis por *Flavobacterium columnare*, Edwardsielosis por *Edwardsiella tarda* y recientemente *Edwardsiella anguillarum*; son los agentes virales y bacterianos más comunes generando pérdidas económicas a la industria piscícola particularmente en cultivos de tilapia (Thangapalam, 2015). La edwardsielosis es una enfermedad sistémica que afecta un amplio rango de peces como son la tilapia, anguilas, el bagre y la carpa, caracterizada por la presentación de lesiones de tipo granulomatoso en órganos como bazo, hígado, riñón, ojo, entre otros (Park, 2012). *Edwardsiella tarda* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* el cual es un bacilo Gram negativo, flagelado, positivo a catalasa e indol, oxidasa negativa, produce H₂S y fermenta la glucosa (Meyer y Bullock 1973; Sechter et al., 1983).

Edwardsiella anguillarum comparte características similares a otros aislamientos de *Edwardsiella*, como la capacidad de crecimiento en condiciones anaeróbicas; sin

embargo, su naturaleza no móvil lo diferenciaba de otros grupos (Bujan et al., 2018). Estas bacterias se aislaron originalmente de anguilas enfermas (*Anguilla* sp.). En China, y los estudios sobre la virulencia de los aislamientos bacterianos de una variedad de especies de peces han aumentado en otros países, incluidos China, Japón, EE. UU. Y Grecia (Katharios et al., 2015; Shao et al., 2015; Armwood et al., 2019).

En Colombia está reportada la Edwardsielosis en tilapias desde el 2004 y en el 2007 se registró un brote severo de esta enfermedad donde se aisló *E. tarda* en el departamento del Meta (Iregui et al., 2004; Rondón, 2007). En el 2017 se presentaron dos brotes de Edwardsielosis, con mortalidades del 40% en el departamento del Meta aislando *E. tarda* y *E. anguillarum* y del 30% en el departamento del Huila aislando *E. anguillarum* (Piñeros et al., 2018).

Además, *E. anguillarum* se ha reportado en múltiples especies como la dorada (Familia Sparidae), mero (*Epinephelous* spp.), ronco rayado azul (*Haemulon sciurus*) y tilapia (*Oreochromis* sp.) (Griffin et al., 2007; Ucko et al., 2016; Buján et al., 2018).

Piñeros et al., (2018), detectaron por inmunohistoquímica la presencia de *Edwardsiella anguillarum* en lesiones granulomatosas en hígado, bazo, riñón y ojo de casos de granjas de producción intensiva de tilapia en Colombia con lesiones histopatológicas compatibles con edwardsielosis, que adicionalmente fueron confirmados por amplificación del gen *gyrB* a partir de aislamientos bacterianos obtenidos del mismo lote evaluado.

Hasta la fecha no se conoce completamente la patobiología de la infección por *Edwardsiella anguillarum* en tilapia, ni las diferencias clínicas y patobiológicas de la enfermedad en comparación con *Edwardsiella tarda*. En la literatura se encuentran reportes de caso de Edwardsielosis por *E. anguillarum* en tilapia en Costa Rica, EEUU, Corea y Colombia así como la caracterización genómica en aislamientos de esta bacteria en tilapia (*Oreochromis* sp.), *Anguilla* sp. y *Diplodus puntazzo* (López-Porras et al., 2018; Barato et al., 2018; Armwood et al., 2019; Katharios et al., 2019; Oh et al., 2020).

El presente estudio buscó caracterizar clínica y patobiológicamente la infección experimental con *E. tarda* y *E. anguillarum* en alevinos de tilapia por tres vías de inoculación: intraperitoneal (IP), intragástrica (IG) e inmersión (INM).

2. ESTADO DEL ARTE

2.1 Acuicultura y el impacto económico de las enfermedades

La acuicultura es probablemente el sector de producción de proteína de origen animal de más rápido crecimiento en el ámbito mundial. Por primera vez en la historia moderna, la producción mundial de piscicultura superó la producción de carne de res. La brecha se amplió en 2012, y la acuicultura, alcanzó un récord de 66 millones de toneladas, en comparación con la producción de carne de vacuno de 63 millones de toneladas (Earth policy, 2018). Siguiendo esta tendencia, Colombia ha tenido un crecimiento de la acuicultura trayendo desarrollo económico y social, que en parte se debe a la riqueza de recursos hídricos para la producción de peces y crustáceos (Parrado, 2012). Según datos del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y FEDEACUA en 2019 en Colombia se muestra que desde el año 2007 hasta el año 2017 la producción piscícola pasó de 63.052 toneladas a 120.230 toneladas, acompañado de la certificación de 13 plantas de proceso, generando incremento en las exportaciones hacia otros países por 7.953 toneladas de carne de pescado al año que representan USD\$ 56.4 millones, siendo el departamento del Huila, el mayor productor en Colombia. La producción nacional en toneladas se encuentra en 120.230 toneladas dividida entre las distintas especies (Tilapia, trucha, cachama, camarón y especies nativas), siendo la tilapia la especie de mayor producción, con aproximadamente 70.000 Ton/año. (SIOC, 2020).

En Colombia a su vez el consumo per cápita de pescado paso de 3.49 kg en el año 2009 a 7.3 kg por persona año para el año 2017 (FEDEACUA, 2019).

En la actualidad la especie de pez que más se produce en Colombia es la mojarra (tilapia) *Oreochromis* sp, originaria de África y perteneciente a la Familia: *Cichlidae*. Esta fue introducida directamente al Instituto Nacional de Piscicultura Tropical en la ciudad de Buga en el Departamento del Valle del Cauca en 1957 procedentes de Brasil (Parrado, 2012). El verdadero auge de la producción de tilapia en Colombia se generó a partir de los años 80 con el ingreso de la tilapia roja en diferentes regiones del país y en la década de los 90 con las exportaciones de filete fresco a Estados Unidos (Parrado, 2012). Actualmente, Colombia ocupa el decimoprimer puesto en la producción mundial de tilapia (61.800 Ton anuales) y el primer puesto como exportador de filete fresco de tilapia para Estados Unidos, con 7.953 Ton anuales (FAO, 2018; FEDEACUA, 2019). Debido a la producción intensiva y a deficientes prácticas de bioseguridad, carencia de programas de control y prevención de enfermedades en Colombia, los sistemas de producción de peces como la tilapia, se han visto afectados por la presentación de enfermedades de tipo bacteriano y viral como es el caso de la estreptococosis estimando que las pérdidas ocasionadas por la enfermedad están entre 30% y 35%, esto hace que las conversiones alimenticias se aumenten y por consiguiente los costos de producción por kilo (González, 2020). Desde 2009 se han presentado mortalidades del 20 al 100% en cultivos de tilapias por la infección por el virus de la tilapia del lago (TiLV). En un análisis sobre el impacto económico de TiLV en un sistema de producción en biofloc de tilapia, con siembra de 80.000 alevinos, la mortalidad generó pérdidas económicas (por \$24.224.151), correspondientes con: Mortalidades (68,52%) - \$ 16.599.000,00 COP, Alimento y equipos (18,54%) - \$4.490.506,38 COP y Diagnóstico y tratamiento (12,94%) - \$3.134.644,00 COP (Cala et al., 2020). Es de resaltar que no hay estudios referentes para el impacto económico de la Edwardsiellosis en la tilapia.

2.2 Edwardsiellosis como enfermedad en peces y otras especies

La Edwardsiellosis es una enfermedad que afecta principalmente a peces, causada por bacterias pertenecientes al género *Edwardsiella* de la familia *Enterobacteriaceae* (Ewing et al., 1965), la cual agrupa bacterias medioambientales y presentes en diferentes hospederos (Griffin et al., 2007). Hasta 2013, el género consistía en 3 especies: *Edwardsiella hoshinae*, *Edwardsiella ictaluri* y *Edwardsiella tarda* (Grimont et al., 1980). *Edwardsiella hoshinae* se describió como agente patógeno de aves y reptiles (Hawke et al., 1981) y *Edwardsiella ictaluri* principalmente en el bagre de canal (*Ictalurus punctatus*), y recientemente se asoció con eventos de mortalidad en tilapia cultivada (*Oreochromis sp.*) (Soto et al., 2012). La *Edwardsiella tarda* es la especie más importante en este género por ser un patógeno versátil con una amplia gama de hospederos, incluidos, aves (White, 1973), peces (Mohanty, 2007) anfibios y reptiles (White, 1984), mamíferos marinos (Coles, 1978) y humanos (Leung, 2012). *E. tarda* se aísla de una variedad de nichos ecológicos, como los lagos y ríos (White, 1973), el agua de mar y los intestinos de animales acuáticos sanos (Kebede, 2016). Desde 1962, los brotes de esta enfermedad han causado importantes pérdidas económicas en diferentes especies de peces comercialmente importantes (Mohanty, 2007), incluidos: bagre de canal (*I. punctatus*), salmonete (*Mugil cephalus*), tilapia (*Oreochromis niloticus*), besugo (*Pagrus major*), lubina (*Dicentrarchus labrax*), lubina (*Morone saxatilis*), cola amarilla (*Seriola quinqueradiata*), lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*), rodaballo (*Scophthalmus maximus*) y lenguado (*Solea senegalensis*) (Castro, 2012), entre otros. *Edwardsiella tarda* es una bacteria que se puede encontrar en ambientes acuáticos y en peces donde genera cuadros septicémicos con abscesos, granulomas y necrosis en tejidos, como cerebro, hígado, bazo, piel y músculo. Por otra parte, se ha reportado infección en humanos generando cuadros gastrointestinales (Verján, 2012). En el 2012 las caracterizaciones fenotípica y genotípica de *E. tarda* demostraron que los aislamientos de *Edwardsiella* en peces no pertenecían a la especie o cualquiera de los taxones previamente establecidos dentro del género *Edwardsiella*, por lo tanto, se

propuso una nueva especie la cual fue *Edwardsiella piscicida* sp. (Abayneh, 2012; Griffin, 2014).

La clasificación errónea con base en las diferencias fenotípicas entre *E. tarda*, *E. piscicida* y *E. anguillarum* hace necesario el uso de técnicas moleculares para una correcta identificación a nivel de especie (Bujan et al., 2018). La infección por *E. piscicida* y la enfermedad por *E. anguillarum* han sido reportadas en tilapias, pero su patobiología y las diferencias en virulencia con *E. tarda*, no han sido estudiados completamente bajo condiciones experimentales (Armwood et al., 2019).

2.3 Coinfecciones con Edwardsielosis en peces

En la literatura se reportan coinfecciones *Edwardsiella tarda* con patógenos bacterianos y virales. Entre los más relevantes se encuentra edwardsielosis con infección por *Streptococcus iniae*, aquabirnavirus y virus de la septicemia hemorrágica vial (VHSV) en lenguado japonés, con *Aeromonas hydrophila* en tilapia roja, y con TiLV en tilapia roja y nilótica (Pakingking Jr. R. et al., 2003; Lee and Wendy, 2017; Barato et al., 2018)

En la etapa de alevinaje de tilapia en Colombia se ha encontrado incrementos de la mortalidad debido a la coinfección con TiLV y *E. tarda*, comprometiendo la productividad de las granjas afectadas (Montufar et al., 2018). El Virus de la Tilapia del Lago - TiLV es un nuevo virus, cuya infección es considerada como una enfermedad emergente. Tiene un genoma de 10 segmentos de ARN monocatenario de sentido negativo lineal. Pertenece a la familia Amnonviridae, género *tilapinevirus* y especie *Tilapia tilapinevirus* (Kibenge, 2016; Bacharach, 2016).

2.4 Edwardsielosis en la Interfaz animal-humano

En los últimos años se ha evidenciado un aumento marcado en la aparición de enfermedades en humanos asociados a los animales domésticos y silvestres e incluso enfermedades que hace años no afectaban a los humanos. Es decir, enfermedades

emergentes y reemergentes, las primeras apareciendo por primera vez o que han sido descritas por primera vez y las últimas siendo aquellas que estaban hace muchos años y se encontraban “controladas” y en tiempos recientes los reportes se han incrementado significativamente. Muchas de estas al ser desconocidas o al estar por fuera de las listas de vigilancia han podido actuar y desarrollar distintos métodos en los que se puede incluir el salto entre especies y pasar desapercibidas. Esto las convierte en una seria amenaza para la salud pública y la seguridad alimentaria, que deben ser controladas y se deben desarrollar estrategias de prevención (Deem S., 2012).

En humanos la infección por *E. tarda* generalmente causa una gastroenteritis con diarrea acuosa a sanguinolenta aguda prolongada o intermitente en personas inmunocomprometidas, adultos mayores o niños. Además, puede cursar con anorexia, falta de apetito y vómitos en niños. En algunos casos la gastroenteritis puede llegar a una colitis ulcerativa (García N. J., 2012). Esta enfermedad es de especial preocupación en aquellos países donde el consumo de pescado crudo es frecuente, pues son una fuente de infección importante para los humanos. Otra manera de infectarse puede ser por accidentes de pesca, contacto con aguas contaminadas o por traumas al abdomen que permitan la traslocación de la bacteria. En caso de traslocación bacteriana en humanos las lesiones pueden ser severas y causar abscesos hepáticos, peritonitis, colangitis, meningitis, bronconeumonía, empiema salpingitis o incluso shock séptico (García NJ., 2012).

Por la falta de información sobre la distribución de las bacterias del género *Edwardsiella* sp, sus efectos sobre distintos animales, el impacto económico que puede tener la entrada de cualquiera de estas bacterias a sistemas productivos de peces, es por esto por lo que esta enfermedad emergente debe ser tomada en cuenta. Se debe empezar a desarrollar estrategias de control en sistemas productivos y la posible infección en humanos, sistemas de alerta, desarrollar tratamientos que resulten efectivos y no contaminantes para el ambiente. Se debe generar más investigación para entender la distribución y la manera de replicarse en los diferentes sistemas biológicos capaces de

infectar, para así plantear estrategias adecuadas y claras para su control y disminución de riesgo a infección.

La asociación de gastroenteritis en humanos al consumo de pescado es alta, generalmente por consumo de pescado que no fue bien cocido o simplemente crudo. La lista de enfermedades que se puede adquirir por el consumo de pescado mal cocido o crudo es muy larga y la mejor manera para prevenir esto es evitar el consumo de pescado crudo y asegurarse que este bien cocido al momento de consumirlo. De todas formas, el consumo de pescado no es la única vía de infección para el humano, debemos tener en cuenta que todas las personas que trabajan en acuicultura y pescadores formales e informales también están en riesgo. Esto porque el manejo del pescado con heridas o sin estas, pero sin guantes es una vía de entrada a los distintos patógenos que poseen los peces. Además, las actividades acuáticas recreativas que frecuentan algunas personas como buceo, snorkel, pesca recreativa, surfear y demás actividades que se pueden hacer en mar o en agua dulce son un riesgo potencial de adquirir la enfermedad, esto por el contacto directo con el agua potencialmente infectada. El riesgo que representa *Edwardsiella* sp. es que tiene la capacidad de infectar una alta cantidad de especies animales, esto quiere decir que por el consumo de animales silvestres o de sus productos puede ser una fuente extra para adquirir la enfermedad.

Esta cercanía que hay entre el humano, los ambientes en los que se puede encontrar la *Edwardsiella* sp. y los animales que la pueden transmitir pueden ser un factor de riesgo para la presentación de la enfermedad en humanos y otras especies. Esto demuestra que es una enfermedad que está completamente desatendida y a raíz de esto se puede estar subdiagnosticando en humanos o ni siquiera se está haciendo. Además de la cercanía con los ambientes en los que se encuentra *Edwardsiella* sp. Existe también el aumento de la demanda de pescado a nivel mundial, pues la producción de carne res fue superada por la piscicultura por primera vez (Earth-policy, 2019). Esto también se puede considerar como una expansión de la frontera agropecuaria, pues cada vez se demanda

más espacio y fuentes hídricas para la producción de acuícola en donde se puede entrar este microorganismo.

Otro punto importante que se debe tener en cuenta es que esta enfermedad al ser transmitida en gran parte por el consumo de alimentos se debe considerar como una ETA (enfermedad transmitida por alimentos). Es decir que la edwardsielosis tiene un potencial de ocasionar brotes o casos que pueden estar siendo diagnosticados como otras ETAs por el poco conocimiento y medidas para el diagnóstico de esta. En este caso el 80% de las infecciones son de tipo gastrointestinal dejando el 20% restante son infecciones extraintestinales por lo general mionecrosis, meningitis, peritonitis con sepsis, bacteremia e infección de heridas (Wang I.K., 2005). Las personas que suelen verse más afectadas son las que tienen una enfermedad concomitante o se encuentran inmunosuprimidos. En general están es riesgo de adquirir la enfermedad los operarios de los piscicultivos, los comerciantes de pescado y los consumidores de pescado (especialmente crudo).

2.5 Edwardsielosis en la interfaz ambiente – animal

Las bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* en general son causantes de un gran número de enfermedades zoonóticas y son habitantes normales de la flora digestiva de distintos animales. En el caso del género *Edwardsiella* se sabe que es un habitante normal del agua, de la microbiota intestinal de los peces y que puede estar presente en distintos animales, sin muchas restricciones. Debemos recordar que por las características propias de la bacteria puede sobrevivir en distintos ambientes sin problema, aunque tiende a generar más brotes en peces que permanecen en aguas a temperaturas entre 14° - 45°C (García NJ., et al, 2012).

Es claro que el cambios climático ha cambiado la dinámica en los ecosistemas marinos y acuáticos continentales, lo cual ha generado alteraciones en el balance, fisicoquímico, ecológico y del microambiente que ha favorecido la presentación de enfermedades

parasitarias, bacterianas y virales, afectando diferentes especies de peces de cultivo (Bong-Tae Kim., 2019) (Custódio da Costa J., 2020) (Nguyen N. P., 2020).

La alta capacidad infectiva de la bacteria y la alta carga ambiental de la misma puede ser la razón por la cual hasta ahora se está empezando a hacer realmente evidente en la acuicultura. Pues debido al aumento en la demanda es que se ha aumentado la producción, es hasta hace unos pocos años que se le dio importancia a esta enfermedad, pero no la suficiente, en definitiva. A raíz del aumento de la presentación de la enfermedad el uso de antibióticos en los peces también aumento y hoy en día ya se han registrado resistencias, siendo la resistencia a los antibióticos una de las amenazas más grandes de la salud pública actualmente. Aparte de la resistencia como consecuencia del uso inadecuado o indiscriminado también se genera una contaminación del ambiente que tiene repercusiones severas sobre el mismo (Acevedo R., 2015) (Andersson D., 2012).

2.6 Hospederos, reservorios y vehículos

Las *Edwardsiella* sp. son bacterias ampliamente distribuidas en el ambiente y en los animales lo que hace muy complicado definir el huésped, los posibles reservorios y vectores. Podemos decir que el huésped y el reservorio son diferentes peces y otros habitantes de cuerpos de agua bien sean salado o dulce. Los peces adultos son portadores de la bacteria y no se ven afectados de manera tan severa como los alevinos en el caso de la tilapia (*Oreochromis* sp.) con *E. anguillarum*.

En el caso de la edwardsielosis no se conocen vectores, en el sentido de artrópodos que lo transmitan, pero si hay vehículos como lo son el agua y los alimentos contaminados.

En aves se ha descrito la presencia de *E. tarda* en la microbiota intestinal de especies carroñeras, por lo que se consideran reservorio del microorganismo en sistemas de producción acuícola (Winsor et al., 1981). Muchas aves consumen pescado y habitan cuerpos de agua o muy cerca a estos por lo que se debe ampliar el conocimiento sobre si estos animales pueden actuar como diseminadores de las bacterias sin ser o siendo

afectados. Esta pregunta aplica para todos los otros animales que también entran en contacto con la bacteria como los reptiles, anfibios, mamíferos y mamíferos marinos. ¿Cuál es el papel de estos animales en la interfaz ambiente-animal-humano?

Otra pregunta importante es cómo se ha logrado distribuir esta bacteria en las producciones piscícolas del mundo y como llegó *E. anguillarum* a Colombia a 2 predios en departamentos distintos.

2.7 Piscicultura y el impacto económico de edwardsielosis

Colombia ha tenido un crecimiento de la acuicultura en diferentes regiones trayendo desarrollo económico y social, que en parte se debe a la riqueza de recursos hídricos para la producción de peces y crustáceos (Parrado, 2012). Actualmente, Colombia ocupa el primer puesto como exportador de filete fresco de tilapia para Estados Unidos, con 7.953 toneladas anuales (FEDEACUA, 2019). Debido a la producción intensiva en peces como la tilapia, se han venido presentando enfermedades de tipo bacteriano, viral y parasitario. Dentro de las bacterianas se puede listar edwardsielosis y aeromoniasis afectando alevinos. Barato *et al.*, (2018) identificaron desde enero de 2017 infección de *Edwardsiella anguillarum* en sistemas de producción de material genético de tilapia del Huila y Meta generando alta mortalidad de forma individual y en coinfección con TiLV y *E. tarda*, comprometiendo la productividad de las granjas afectadas (Barato P., 2018). En la actualidad no está cuantificada el efecto de la edwardsielosis y posibles coinfecciones en sistemas de producción de material genético de tilapia.

3. OBJETIVOS

3.1 General

Caracterizar clínica y patobiológicamente la infección experimental con *Edwardsiella tarda* y *Edwardsiella anguillarum* en alevinos de tilapia (*Oreochromis* sp.)

3.2 Específicos

3.2.1 Implementar un modelo *in vivo* de infección por vía intragástrica, intraperitoneal y por inmersión en alevinos de tilapia (*Oreochromis* sp.) con *Edwardsiella tarda* y *Edwardsiella anguillarum*.

3.2.2 Caracterizar clínica y patobiológicamente la edwardsielosis en alevinos de tilapia (*Oreochromis* sp.)

4 METODOLOGÍA

4.1 Tiempo y área del estudio

La investigación se llevó a cabo entre octubre de 2018 y diciembre de 2019, en el Bioterio de peces y laboratorios de la Corporación de Patología Veterinaria CORPAVET en la ciudad de Bogotá.

4.2 Tipo de estudio

Se realizó un tipo de estudio experimental para caracterizar clínica y patobiológicamente la infección con *E. tarda* y *E. anguillarum* en alevinos de *Oreochromis* sp.

4.3 Criterios de selección de los peces.

Las condiciones experimentales de los peces fueron aprobadas por el comité de Bioética de CORPAVET.

Los criterios de punto final del experimento por compromiso del bienestar animal en los modelos experimentales fueron de acuerdo con OECD así:

Para experimentos de 96 horas, 7, 15 y 28 días:

En el cual se acepta el lote experimental con mortalidades menores al 5% de la población a las 48 horas de inicio del ensayo (OECD, 2019).

4.4 Obtención, recepción de los animales experimentales (larvas) y evaluación de su estatus sanitario

Previo a la recepción de los animales, en el área de cría del bioterio se adecuaron tanques plásticos de 50 litros, los cuales se desinfectaron con hipoclorito de sodio a una concentración de 20ppm durante 60min (FAO, 2004). Se utilizó agua lluvia acondicionada con los parámetros fisicoquímicos adecuados para la especie (T: 27 a 30°C; pH: 7 – 7,5; OD: 3,8 a 4,5g/dl y saturación 65-75%). Se dejó con aireación,

termostato a 30°C y filtro individual durante 5 días evaluando los parámetros fisicoquímicos del agua (Oxígeno, temperatura y pH) antes del ingreso de los peces.

Las larvas se obtuvieron de una granja piscícola comercial de producción del departamento del Huila, se empacaron en bolsas con agua y oxígeno, donde la relación fue de 1:3 y se trasladaron al Bioterio de peces de CORPAVET. A la llegada se tomaron 14 larvas para evaluación de su estado sanitario con preparaciones en fresco de piel, branquias, bazo e hígado y se tomó un pool de 15 larvas para aislamiento bacteriológico, RT-PCR para el segmento 3 del Virus de la Tilapia del Lago – TiLV, y PCR convencional para detección del gen *gyrB* de *E. tarda* y *E. anguillarum*. (Eyngor et al., 2014; Reichley et al., 2015; Reichley et al., 2017).

Se cultivaron las larvas bajo condiciones de laboratorio hasta que alcanzaron una talla de 3 a 5 cm con un peso de 3 a 5 gramos (aproximadamente 2,5 meses) en acuarios de 20 litros a una densidad de 2,4g de biomasa/litro, con una mortalidad inferior del 5%. Al alcanzar este peso los animales se trasladaron al área experimental para iniciar los ensayos de los modelos de infección.

4.5 Bacterias de estudio

Aislamientos de *E. tarda* (18-294) y *E. anguillarum* (18-355) provenientes de alevinos de tilapia con Edwardsiellosis, fueron caracterizadas filogenéticamente mediante secuenciación de gen *gyrB* y rep-PCR (repetitive sequence-mediated PCR analysis) de *Edwardsiella* sp. en Mississippi State University, College of Veterinary Medicine por el Dr. Matt Griffin (Barato et al., 2018) y crioconservados a -30°C en BHI caldo (Brain Heart Infusión Ref 1.10493, Merck, Alemania) y glicerol al 87%, hasta su uso en los procedimientos experimentales.

Previo a la inoculación, se descongelaron las cepas y se sembraron e incubaron en caldo BHI (Ref 1.10493, Merck, Alemania) a 30°C por 48 horas. Se calculó inicialmente la dosis infectiva con escala McFarland para preparar el inóculo, el cual fue confirmado

posteriormente por cultivo de 100ul del inóculo de diluciones en base 10 para determinar las Unidades Formadoras de Colonia/ml (UFC/ml) en agar MacConkey (Figura 1 y 2). Se verificó la identidad de las bacterias sembradas por amplificación del gen *gyrB* por PCR convencional (Reichley et al., 2017). *Edwardsiella tarda* (18-294) y *Edwardsiella anguillarum* (18-355) fueron cultivadas en caldo BHI y agar MacConkey para recuperarlas de las condiciones de congelación a -20°C. Ambas bacterias crecieron adecuadamente a 30°C durante 48 horas.



Figura 1. Cultivo de *E. tarda* y *E. anguillarum* en medio selectivo agar MacConkey. (Fotos P. Barato., R. Piñeros., J. Hernández).



Figura 2. Crecimiento de colonias de *Edwardsiella anguillarum* en agar Mac Conkey al cultivo de 100ul del inóculo en la dilución 10^{-3} para confirmar la dosis final de inoculación por recuento de ufc/ml. (Fotos P. Barato., R. Piñeros., J. Hernández).

4.6 Modelo de infección *in vivo* con *E. tarda* y *E. anguillarum* por inmersión (INM), inoculación intragástrica (IG) e intraperitoneal (IP) en alevinos de tilapia de 3 a 5 cm de talla y 3 a 5 gr de peso en promedio (Reed, 1938).

Los alevinos del área de cría se trasladaron a acuarios de 20 litros en el área experimental (Fig. 3)



Figura 3. Acuarios del área experimental con 10 peces cada uno para ensayos de infección *in vivo*. (Fotos P. Barato., R. Piñeros., J. Hernández).

El modelo experimental incluyó la inducción de factores de riesgo de enfermedad como alta manipulación y alta densidad de siembra (biomasa/litro) asegurando el desarrollo de la enfermedad.

Alevinos de 3 a 5g y talla de 3 a 5 cm se inocularon con un volumen de 50 μ l de *E. tarda* y *E. anguillarum* por vía intraperitoneal (IP), se inyectaron en la cavidad celómica en el área caudoventral anterior al agujero anal, con una jeringa 1 ml en un ángulo de 45°. Por la vía intragástrica (IG), se descargó con una micropipeta un volumen de 50 μ l de *E. tarda* y *E. anguillarum* directamente en el estómago introduciendo vía oral una punta de

pipeta de 200ul. Para la inoculación por inmersión (INM) se disminuyó el volumen de los acuarios hasta 10 litros de agua cada uno y se adicionó 100 ml del inóculo por una hora, posteriormente se realizó la reposición de agua completando el volumen a 20 litros.

Se eligieron las tres vías de inoculación con los siguientes objetivos:

Intraperitoneal (IP): Para asegurar la replicación experimental de la edwardsielosis ya que se garantiza el ingreso del patógeno al organismo. Es la vía no natural.

Intragástrica (IG): Es una de las vías naturales de infección. Se ha encontrado una gran población de *Edwardsiella tarda* en intestino anterior en las replications experimentales de edwardsielosis en otras especies de peces (Ling et al., 2001)

Inmersión (INM): Es conocido que cepas virulentas de *Edwardsiella tarda* presentes en el agua se adhieren a las escamas y moco de la superficie de la piel de los peces, proliferan en la superficie corporal e invaden el tejido muscular causando lesiones y hemorragias. A partir del contacto con el agua, *E. tarda* puede adherirse, ingresar e invadir el hospedero a través de las branquias y el tracto gastrointestinal (Ling et al., 2001).

Para la vía de inoculación IP se evaluaron dos dosis bacterianas, 10^6 UFC/ml y/o 10^7 UFC/ml y para las vías IG e INM se inocularon las dosis 10^6 UFC/ml, 10^7 UFC/ml y/o 10^8 UFC/ml. Se definieron 19 grupos experimentales con dos repeticiones cada uno, incluyendo controles negativos con inoculación de solución salina fisiológica estéril (SSF) por cada vía de inoculación, como se presenta en la tabla 1 y figura 4. Los alevinos se monitorearon las primeras 48 horas c/2h, posteriormente 3 veces/día por 13 días y finalmente 3 veces/día hasta completar los 30 días post – inoculación. A los peces que morían se les tomaban muestras para análisis histopatológico, bacteriológico y molecular. Adicionalmente, el 50% de los peces sobrevivientes en cada grupo experimental fue sacrificado al día 15 postinoculación (Fase I) y al 50% restante se le continuó el monitoreo hasta el día 30 (Fase II). Al final de cada fase los peces

sacrificados también fueron pesados y procesados para análisis histopatológico, bacteriológico y molecular.

Tabla 1. Grupos experimentales para inoculación in vivo de *E. tarda* y *E. anguillarum*.

Grupo experimental	Inóculo	Dosis (ufc/ml)	Vía inoculación	n peces
Grupo 1	<i>E. anguillarum</i>	10^6	IP	17
Grupo 2			IG	18
Grupo 3			INM	17
Grupo 4		10^7	IP	17
Grupo 5			IG	18
Grupo 6			INM	17
Grupo 7		10^8	IG	16
Grupo 8			INM	16
Grupo 9	<i>E. tarda</i>	10^6	IP	16
Grupo 10			IG	16
Grupo 11			INM	16
Grupo 12		10^7	IP	16
Grupo 13			IG	16
Grupo 14			INM	16
Grupo 15		10^8	IG	14
Grupo 16			INM	14
Grupo 17	SSF	CONTROL NEGATIVO	IP	33
Grupo 18			IG	33
Grupo 19			INM	34

4.7. Evaluación clínica, necropsia y pesaje de animales experimentales

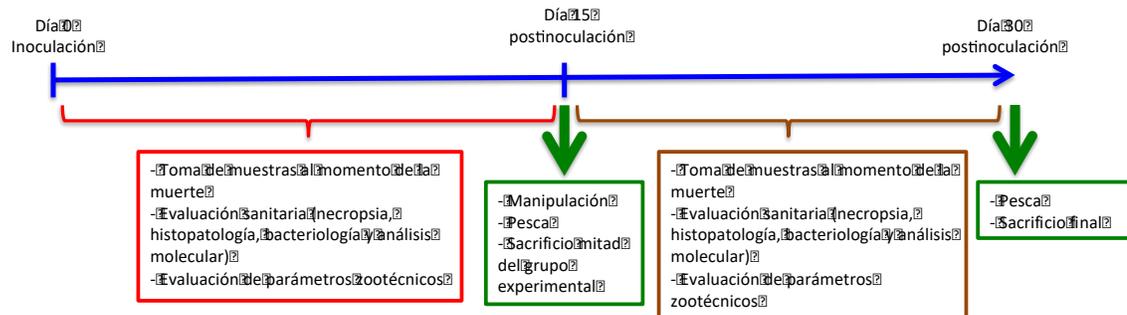
Durante todo el periodo experimental (30 días) los peces fueron evaluados clínicamente de acuerdo con los siguientes criterios: Nado errático, pérdida de reflejo de huida, ubicación en el fondo del estanque y poca voracidad o apetito. Para cada criterio se calificó su presencia o ausencia diariamente.

Al día 15 postinoculación el 50% de los peces sobrevivientes en cada grupo experimental fueron manipulados por pesca, con retiro de aireadores y termostatos hasta

que el OD se redujo a 2.0 g/dl y la temperatura del agua descendió a 24°C; después de 6 horas se restituyeron los parámetros fisicoquímicos experimentales del agua (T: 27 a 30°C; pH: 7 – 7,5; OD: 3,8 a 4,5g/dl y saturación 65-75%) después de 6 horas y se monitorearon los signos clínicos hasta completar 30 días postinoculación (Fig. 6).

MODELO DE INFECCIÓN

IMMERSIÓN INTRAGÁSTRICO



INTRAPERITONEAL

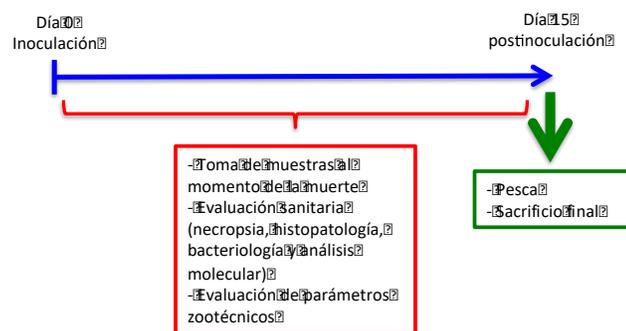


Figura 4. Modelo de infección in vivo para inoculación vía intragástrica, por inmersión e intraperitoneal y periodos de experimentación de cada modelo.

Los criterios para calificar los hallazgos a la necropsia fueron: palidez generalizada, palidez en branquias, distensión abdominal con acúmulo de líquido (ascitis), esplenomegalia, hepatomegalia, vesícula biliar pletórica y ausencia de alimento en la luz de tracto gastrointestinal. A cada criterio se les asignó la calificación de presencia o ausencia.

Se pesaron los alevinos en tres momentos: al día 0 inicio del experimento, al día 15 (primera fase) y al día 30 culminación del experimento (segunda fase). Se hizo un análisis de varianza, buscando establecer posibles variaciones entre las medias de los

diferentes grupos experimentales y frente a los controles.

4.8 Análisis estadístico

Se hizo estadística descriptiva por frecuencia de presencia o ausencia de lesiones. Se organizó la información en hojas de cálculo de Excel para su análisis. Para determinar diferencias estadísticamente significativas entre grupos experimentales se hizo chi-cuadrado.

5. RESULTADOS

5.1 Animales experimentales

Las larvas recibidas en el bioterio para ser criadas hasta el peso requerido para los ensayos de infección fueron negativas para el aislamiento y la detección del genoma de TiLV, *Edwardsiella anguillarum* y *Edwardsiella tarda*. La evaluación en fresco de las mismas no mostró lesiones relevantes y no presentaban parasitismos externos. Dos meses y medio posteriores a su recepción se contó con aproximadamente 400 alevinos sanos de tilapia de 3 a 5cm y 3 a 5g de peso para iniciar los experimentos.

5.2 Cuantificación de *Edwardsiella tarda* (18-294) y *Edwardsiella anguillarum* (18-355) para inoculación experimental *in vivo*

Se construyeron curvas de crecimiento y se hizo recuento de unidades formadoras de colonia (ufc/ml) en cada ocasión en la que se usó para inoculación en las tilapias.

En la figura 5 se presentan las curvas de cuantificación de ufc/ml utilizados en los experimentos para replicar la edwardsielosis en tilapias.

La dosis final de inoculación en cada ensayo se definió por el recuento de unidades formadoras de colonia en agar MacConkey y los resultados se presentan en la tabla 2.

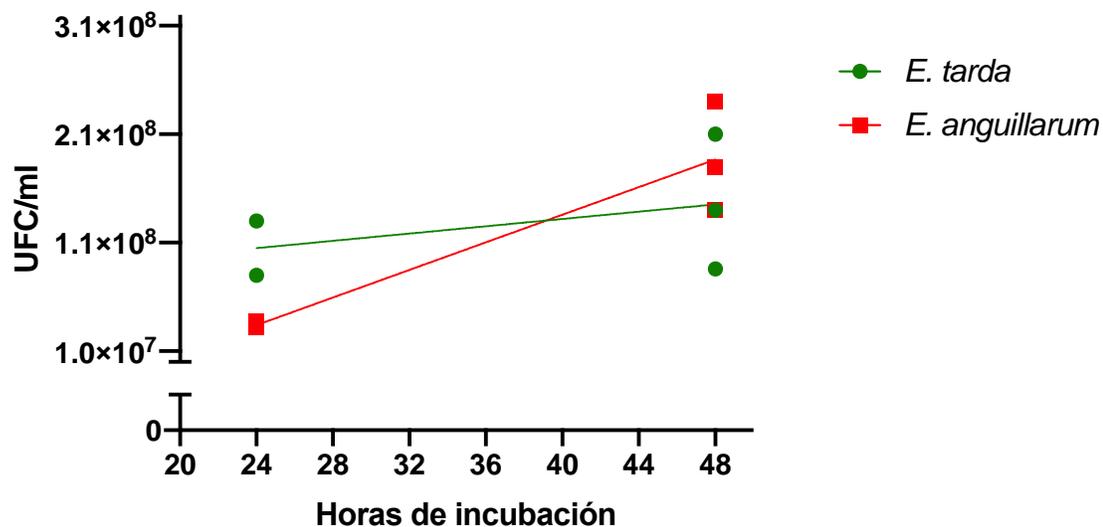


Figura 5. Crecimiento (UFC/ml) de *Edwardsiella tarda* y *Edwardsiella anguillarum*

Tabla 2. Dosis de inóculos utilizados en los ensayos de inoculación Intraperitoneal (IP), intragástrica (IG) e inmersión (INM) de *E. tarda* y *E. anguillarum* en alevinos de tilapia (*Oreochromis* sp.)

VÍA DE INOCULACIÓN	UFC/ml	
	<i>E. anguillarum</i>	<i>E. tarda</i>
IP	2,4 x 10 ⁶	2,5 x 10 ⁶
	2,4 x 10 ⁷	2,0 x 10 ⁷
IG	1,4 X 10 ⁶	1,3 X 10 ⁶
	1,4 X 10 ⁷	1,3 X 10 ⁷
	1,4 X 10 ⁸	1,3 X 10 ⁸
INM	1,8 x 10 ⁶	4,0 x 10 ⁶
	1,8 x 10 ⁷	4,0 x 10 ⁷
	1,8 x 10 ⁸	4,0 x 10 ⁸

Todos los inóculos fueron evaluados por PCR (amplificación gen *gyr B*) y se confirmó su identificación como *E. anguillarum* o *E. tarda*.

5.3 Replicación experimental de edwardsielosis por *Edwardsiella anguillarum* en alevinos de tilapia

Todos los peces controles negativos por las tres vías (IP, IG e INM) sobrevivieron durante los 30 días del ensayo sin presentar lesiones macro o microscópicas. Los peces inoculados con *E. anguillarum* (18-355) por vía intraperitoneal murieron durante los primeros 7 días post-inoculación (PI) (Fig. 6). Los peces con mortalidad en los primeros 3 días no mostraron lesiones macroscópicas. Después del día 4PI los peces presentaron ascitis, nódulos blanquecinos en peritoneo y bazo, hepatomegalia, esplenomegalia, ausencia de alimento en el intestino y distensión de la vesícula biliar (Fig. 7B). Con la misma bacteria, por inoculación IG e INM durante un periodo de 15 días, la mortalidad fue dependiente de la dosis. Por la vía IG con 10^6 ufc/ml se presentó el 25% de mortalidad, con 10^7 ufc/ml el 33% y con 10^8 ufc/ml el 58%. En la inoculación por INM a 10^6 ufc/ml no se presentó mortalidad durante los primeros 15 días de estudio. A 10^7 ufc/ml el 50% de los peces murieron y con 10^8 ufc/ml fue del 55% (Fig. 6). 24 horas antes de morir todos los peces mostraron nado errático, pérdida del apetito, letargia y ubicación en el fondo del tanque. Desde el séptimo día PI por inoculación IG e INM las lesiones macroscópicas fueron similares a la de los peces inoculados vía IP, presentando adicionalmente masas blanquecinas multifocales en hígado (Fig. 7C).

Al día 15PI, el 50% de los peces sobrevivientes por inoculación IG e INM fueron sacrificados para evaluar el estatus de la infección por histopatología, aislamiento bacteriológico y PCR. Los peces restantes de cada dosis (IG: 4 tilapias para 10^6 ufc/ml y 10^7 ufc/ml y 2 peces para 10^8 ufc/ml, e IMM: 10 peces para 10^6 ufc/ml, 5 para 10^7 ufc/ml y 4 para 10^8 ufc/ml) fueron manipulados durante la pesca y se evaluaron por 15 días más para definir el efecto del manejo en la infección crónica. No hubo mortalidad del día 15 al 30 PI en los peces inoculados por inmersión. De las tilapias inoculadas intragástricamente, murieron el 50% (n=2/4) con 10^6 ufc/ml, el 25% (n=1/4) con 10^7 ufc/ml y ninguno (n=0/2) con 10^8 ufc/ml. Se aisló *E. anguillarum* de los peces que murieron por vía IP el día 2 (6 peces) en dosis 2.4×10^7 , el día 7 (13 peces) en dosis 2.4×10^6 , por vía IG el día 4 (2 peces) en dosis 1.4×10^8 y por vía INM el día 8 (2 peces)

en dosis 1.8×10^8 , el día 11 (4 peces) en dosis 1.8×10^7 y el día 13 (3 peces) en dosis 1.8×10^8 de los peces inoculados por las diferentes vías.

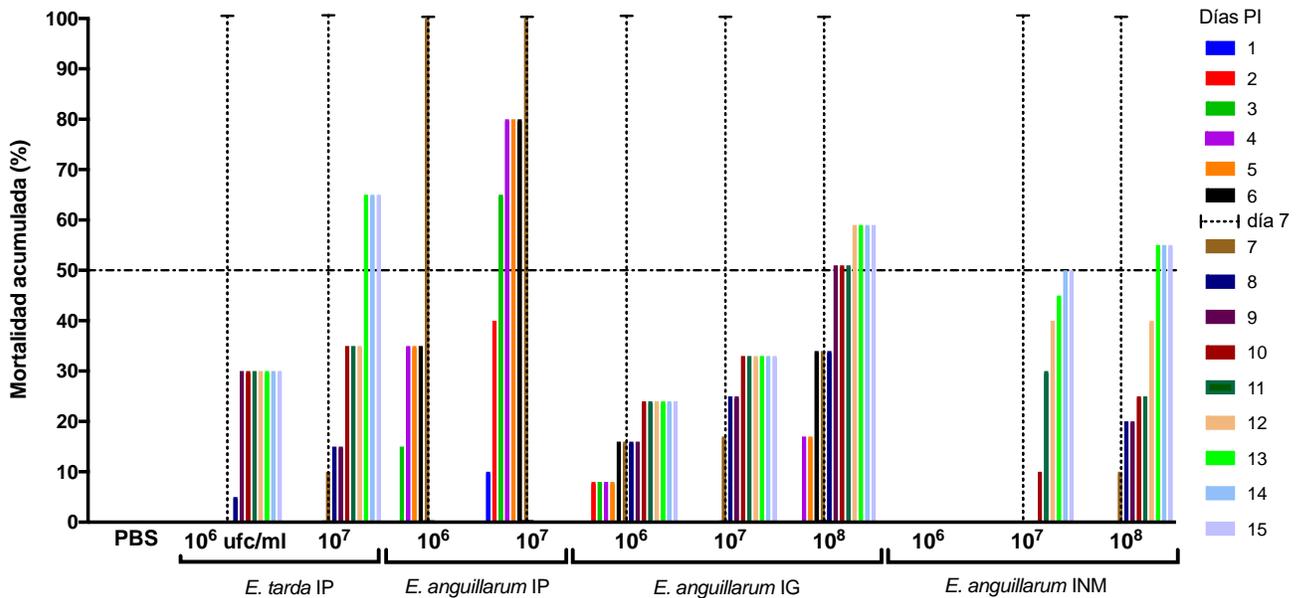


Figura 6. Mortalidad acumulada del día 1 al 15 postinoculación (PI) vía intraperitoneal (IP), intragástrica (IG) y por inmersión (INM) de *E. tarda* y *E. anguillarum* en alevinos de tilapia. Los peces inoculados con *E. tarda* vía IG e INM no presentaron mortalidad a los 15 días PI. Día 7 postinoculación; Porcentaje mortalidad acumulada 50%.

...

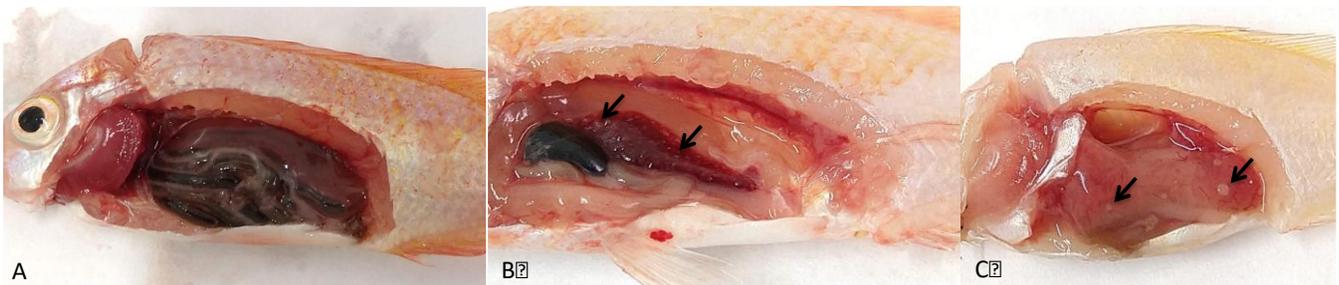


Figura 7. Lesiones macroscópicas de tilapias inoculadas con *E. anguillarum*. A. Alevino de tilapia control negativo por inmersión a los 30 días PI; intestino con contenido, hígado color café con morfología normal. B. Alevino de tilapia inoculado IP con 10^7 ufc/ml a los 7 días PI; se observa esplenomegalia con múltiples nódulos blanquecinos puntiformes distribuidas al azar (flechas), vesícula biliar plétorica, hígado pálido e

intestino sin contenido. C. Alevino de tilapia inoculado INM con 10^8 ufc/ml a los 7 días PI; se observa hepatomegalia con múltiples masas blanquecinas distribuidas al azar (flechas). (Fotos P. Barato., R. Piñeros., J. Hernández).

5.4 Replicación experimental de edwardsielosis por *Edwardsiella tarda* en alevinos de tilapia

Los peces inoculados con *E. tarda* (18-294) por vía intraperitoneal murieron entre 7 a 15 días post-inoculación (PI) (Fig. 6). Después del día 8PI con 10^6 ufc/ml y desde el día 7PI con 10^7 ufc/ml los peces presentaron ascitis, hepatomegalia, esplenomegalia, ausencia de alimento en el intestino y distensión de la vesícula biliar; entre el 5 al 50% de los peces inoculados presentaron masas blanquecinas en peritoneo y bazo (Fig. 8). Con la misma bacteria, por inoculación IG e INM durante un periodo de 1 a 15 días PI no hubo mortalidad. 24 horas antes de morir los peces mostraron pérdida del apetito, letargia y ubicación en el fondo del tanque; el nado errático no se presentó en los peces inoculados.

Al día 15PI, el 50% de los peces sobrevivientes por inoculación IG e INM fueron sacrificados para evaluar el estatus de la infección por histopatología, aislamiento bacteriológico y PCR. Los peces restantes de cada dosis fueron manipulados durante la pesca y se evaluaron por 15 días más para definir el efecto del manejo en la infección crónica. Del día 15 al 30 PI los peces inoculados por inmersión con 10^8 ufc/ml tuvieron el 43% de mortalidad. En el resto peces inoculados con las demás dosis no se presentó mortalidad en este periodo. Se reaisló *E. tarda* en los peces que murieron por vía IP el día 9 (5 peces) en la dosis 2.5×10^6 y el día 10 (4 peces) en dosis 2.0×10^7 , por las otras vías no hubo reaislamiento ya que no tuvimos mortalidades durante los primeros 15 días PI.

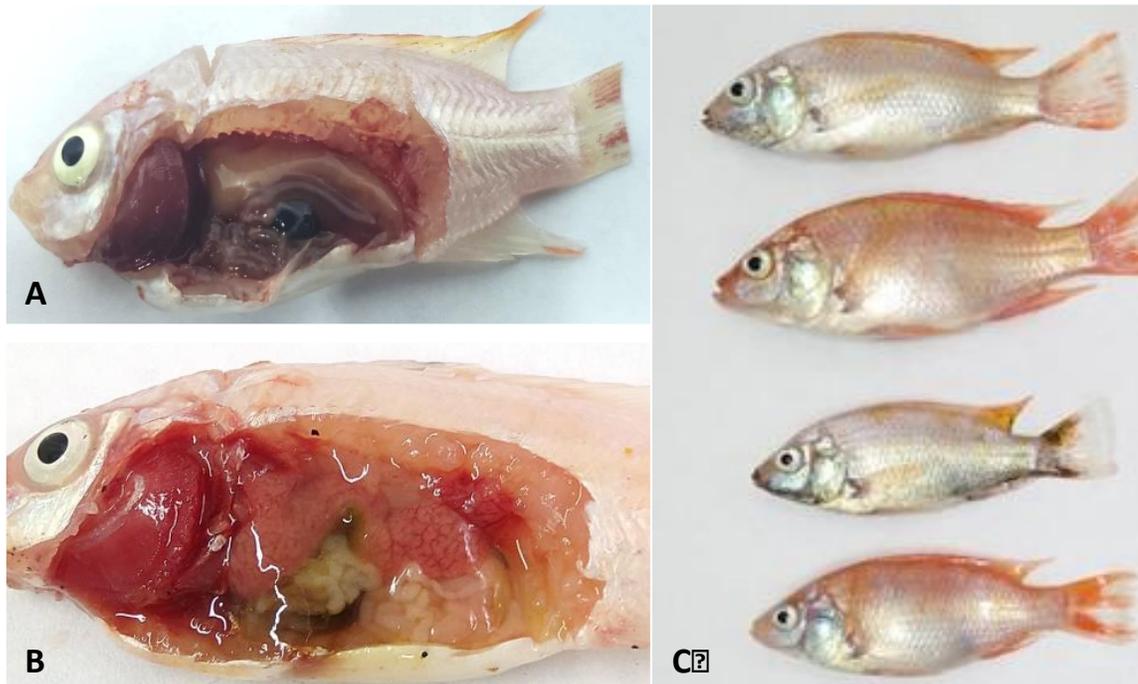


Figura 8. Lesiones macroscópicas de tilapias inoculadas con *E. tarda*. A. Alevino de tilapia inoculado vía IP con 10^7 ufc/ml a los 15 días PI; hepatomegalia, esplenomegalia e intestino sin contenido. B. Alevino de tilapia inoculado por INM con 10^8 ufc/ml a los 30 días PI; se observa hepatomegalia, hígado pálido e intestino sin contenido. C. Alevinos de tilapia inoculados INM con 10^8 ufc/ml a los 30 días PI; se observa disparidad en las tallas. (Fotos P. Barato., R. Piñeros., J. Hernández).

5.5 Reducción de ganancia de peso al final del ensayo (30 días PI) en los peces inoculados con *E. anguillarum* y *E. tarda* tanto por vía IG y INM

El peso promedio de los alevinos de tilapia al inicio del ensayo fue 2,85g ($\pm 0,34$ g). A los 15 días postinoculación los peces pesaron en promedio 5,20g ($\pm 0,82$ g) y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos experimentales, ni vías de inoculación. Al día 30 PI se observaron diferencias significativas en el peso entre el grupo control y los inoculados con *E. anguillarum* y *E. tarda*. La ganancia de peso al final del ensayo (30 días PI) en los peces inoculados con *E. anguillarum* y *E. tarda* tanto por vía IG y INM, se vio afectada y fue evidente con el menor peso de los peces inoculados en comparación con los controles. Los peces inoculados por vía IG con *E. tarda* alcanzaron en promedio 5,42g ($\pm 1,17$ g) y los inoculados con *E. anguillarum* por la

misma vía tuvieron (5,24g, $\pm 0,92$ g) a los 30 días PI ($P < 0,0001$). Adicionalmente, los peces inoculados con 10^8 ufc/ml de *E. tarda* mostraron diferencias significativas en la ganancia de peces entre el día 15 PI (3,06g, $\pm 0,26$ g) y el día 30 PI (5,24g, $\pm 1,39$ g). (Figs. 8 y 9).

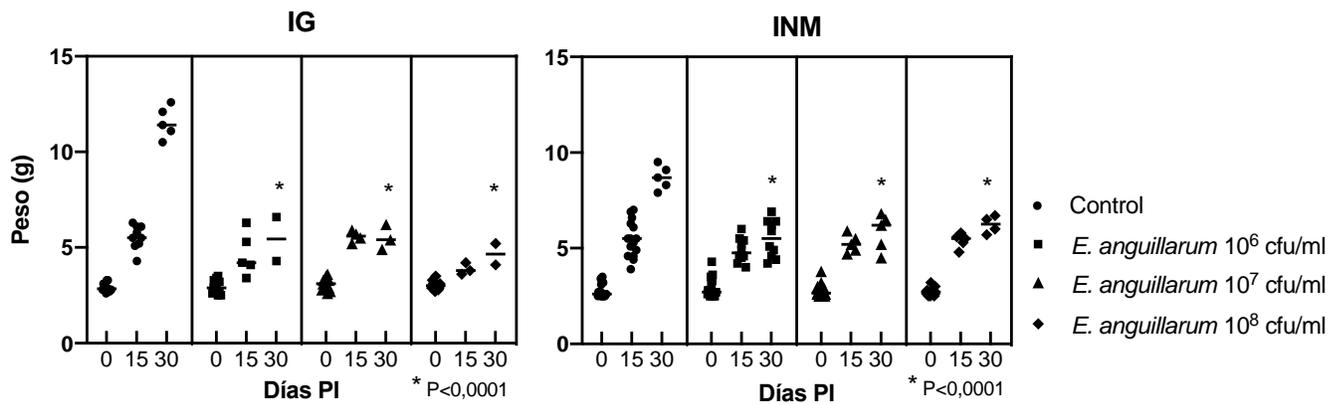


Figura 9. Peso de alevinos a día 0, 15 y 30 PI de *E. anguillarum* por vía IG e INM (* $P < 0,0001$)

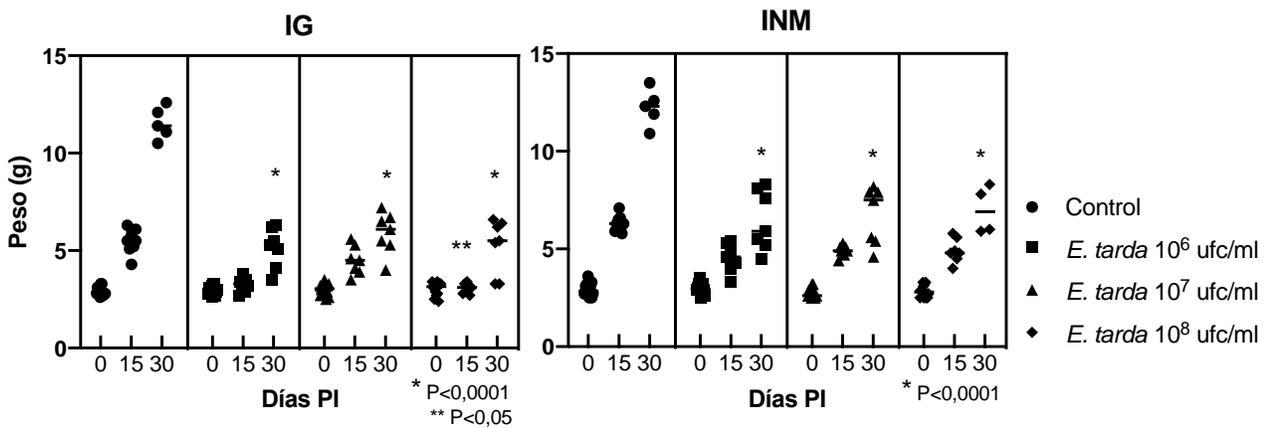


Figura 10. Peso de alevinos a día 0, 15 y 30 PI de *E. tarda* por vía IG e INM (* $P < 0,0001$; ** $P < 0,05$)

En el caso de la inoculación por INM, las tilapias control pesaron en promedio 8,7g ($\pm 0,63$ g) a los 30 días PI. Los inoculados INM con *E. anguillarum* terminaron el ensayo

con 5,74g ($\pm 0,89$ g) ($P < 0,0001$) y los inoculados con *E. tarda* concluyeron el estudio con 6,67g ($\pm 1,38$ g) ($P < 0,0001$) (Figs. 9 y 10).

6 DISCUSIÓN

En esta investigación, a través de un modelo experimental que permitía evaluar el efecto agudo y crónico de la edwardsielosis, se encontraron diferencias en la mortalidad, la patogenicidad y el efecto en parámetros zootécnicos entre la infección por *E. tarda* y *E. anguillarum* en alevinos de tilapia.

La mortalidad por *E. tarda* fue inferior respecto a *E. anguillarum* en los tres modelos de infección (IP, IG e INM) con las mismas dosis. La mortalidad por la vía IP, que no es la vía natural, para *E. anguillarum* fue del 100% en el periodo de 1 a 15 días independientemente de la dosis ($2,4 \times 10^6$ ufc/ml y $2,4 \times 10^7$ ufc/ml), similar a lo descrito por Oh et al., (2020) quienes inocularon tilapias de 20g con *E. anguillarum*, vía IP, con 3×10^7 ufc/ml y con evaluación durante 15 días, tuvieron 0% supervivencia y con una dosis de 3×10^6 ufc/ml, únicamente sobrevivió el 20%. Por vía IP en nuestro estudio, la *E. tarda* con dosis 10^7 ufc/ml alcanzó el 65% de mortalidad a los 15 días y con la menor dosis evaluada ($2,5 \times 10^6$ ufc/ml) la mortalidad máxima fue del 30%. En el caso de la inoculación IG y por INM, con *E. anguillarum* la mortalidad fue dosis-dependiente y con *E. tarda* por estas vías no se presentaron muertes durante el periodo de estudio (30 días) (Fig. 6). Los peces inoculados con *E. anguillarum* mostraron masas blanquecinas en peritoneo, bazo e hígado, compatibles con granulomas, desde el 4 día PI (Fig. 7). Aquellos inoculados con *E. tarda* presentaron este tipo de lesiones en peritoneo y bazo a partir del día 7PI y en el 5% al 50% de los peces inoculados, dependiendo la dosis (Fig. 8).

Lo primero que demuestran estos resultados, es la diferencia en virulencia para causar muerte aguda y lesiones macroscópicas a dosis similares entre las dos bacterias, lo que sugiere que la divergencia taxonómica descrita por Reichley et al. (2014) no solo

corresponde a variedades filogenéticas, sino también a diferencias en la virulencia y patogenicidad. Posiblemente, la expresión de algunos factores de virulencia asociados a estos mecanismos es diferencial, lo que le conferiría mayor patogenicidad a *E. anguillarum*. Por esta razón, una primera recomendación que se deriva de este estudio es la necesidad de hacer necropsias en campo para observar lesiones macroscópicas compatibles con granulomas en bazo e hígado, y adicionalmente identificar la bacteria causante de edwardisosis entre *E. anguillarum* y/o *E. tarda* ya que su curso clínico es diferente.

En relación con los factores de virulencia, en el caso de *E. tarda* se han descrito múltiples factores asociados a la patogénesis, entre ellos: el sistema de secreción tipo III T3SS, el sistema de secreción tipo VI T6SS (particularmente la proteína efectora EvpP secretada por T6SS), la proteína como-adhesina fimbrial (*fimA*), genes relacionados con flagelos (*flhDC*, *fliA*, *fliC*), proteínas externas de membrana, adhesinas (AIDA), reguladores de toma de hierro (*Fur*), hemolisinas (*EthA* y *EthB*), proteasas, catalasas, LPS, sistemas de transducción de señales de dos componentes (*EsrA-EsrB*, *PhoP-PhoQ*), quorum sensing (*QseB* y *QseC*, particularmente importante en la invasión y sobrevivencia de *Edwardsiella* sp. intracelularmente en los macrófagos), entre otros (Lv et al., 2012; Xu and Zhang, 2014; Katharios et al., 2020). En una reciente caracterización de cepas altamente virulentas de *E. anguillarum* en *Diplonius puntazzo* (sargo picudo), se encontró delección de 36 nucleótidos en la secuencia del gen de la proteína flagelar *flhB* al igual que en *E. tarda*, lo que la hace no mótil, y la presencia de una proteína hipotética (*orf20*) que no estaba presente en el genoma de *E. piscicida* con el que se comparó; los demás genes de factores de virulencia fueron altamente similares (>95%) (Katharios et al., 2020). A la fecha, y en parte por la reciente reclasificación taxonómica entre *E. tarda*, *E. anguillarum* y *E. piscicida*, no hay suficiente información sobre la caracterización de las diferencias de expresión de genes de virulencia entre estas bacterias (Reichley et al., 2015). Lo que deja claro nuestra investigación, es que en el caso de la infección por *E. tarda* y *E. anguillarum* en alevinos de tilapia, su

comportamiento clínico y patológico es diferente. Se requieren posteriores estudios para dilucidar genómicamente dichas diferencias.

Investigaciones relacionadas con el impacto de la infección por *E. anguillarum* en peces y su patología son escasas; sin embargo, todos los reportes a la fecha indican mayor patogenicidad y virulencia de esta bacteria en diversas especies de peces teleósteos, similares a las reportadas en nuestro estudio (Abayneh et al., 2012; Reichley et al., 2015; Reichley et al., 2018; Armwood et al., 2019; Oh et al., 2020; Katharius et al., 2020).

La única característica común en el curso clínico de la infección por *E. tarda* y *E. anguillarum* fue la presentación de signos clínicos desde 24 horas antes de la muerte del pez, independientemente del momento del deceso. Se observó nado errático, pérdida del reflejo de huida, poca voracidad y ubicación en el fondo del tanque. Estos signos son inespecíficos y sugieren que cerca al momento de la muerte, las lesiones causadas por *E. tarda* y *E. anguillarum* reflejan alteración en los mecanismos básicos de sobrevivencia.

Los patógenos bacterianos utilizan diferentes sistemas de secreción de proteínas para sus factores de virulencia (Zhen et al., 2007). Entre estos, el sistema de secreción tipo III (T3SS), presente en bacterias Gram-negativas, transporta proteínas efectoras del citosol bacteriano a la célula hospedera que luego intervienen en la alteración del metabolismo celular (Mota et al., 2005). Al igual que el T3SS también está el sistema de secreción tipo VI (T6SS), capaz de transportar proteínas efectoras directamente al citosol de la célula hospedera, incluyendo una proteína chaperona con actividad ATPasa que genera un canal que comunica la membrana interna con la membrana externa y una proteína que forma un poro (Shrivastava, 2008; Bingle et al., 2008). Estos mecanismos de virulencia han sido descritos para *Vibrio cholerae*, *Edwardsiella tarda*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Francisella tularensis* y *Burkholderia mallei* infectando humanos, animales y plantas (Bingle et al., 2008). Se ha descubierto que el sistema de dos componentes EsrA-EsrB en *E. tarda* juega un papel clave en la regulación del sistema de secreción tipo III (TTSS) y el sistema de secreción tipo VI (T6SS) (Wang., 2009).

Se han investigado distintos sistemas de traducción de señales (TCS) de EsrA-EsrB, componentes identificados para *E. tarda*. Mutantes sin estos sistemas fueron estudiados a fondo para determinar la formación de biopelículas, la resistencia a los antibióticos, la respuesta al estrés, la expresión y la secreción de proteínas involucradas en el sistema de secreción de tipo III (T3SS) o el sistema de secreción de tipo VI (T6SS), así como la virulencia, demostrando que EsrB y PhoP son esenciales para la patogenicidad de *E. tarda* y además tienen contribuciones codependientes e independientes a la virulencia (Lv et al., 2012).

La Evp, proteína que confiere virulencia a *E. tarda*, hace parte del sistema T6SS que agrupa 16 proteínas. El primer grupo comprende 11 proteínas del aparato no secretadas y posiblemente intracelulares. El segundo grupo incluye tres proteínas secretadas (EvpC, EvpI y EvpP) (Zheng et al., 2007; Wang et al., 2009). La secreción de EvpC y EvpI depende mutuamente de su interacción, y son necesarios para la secreción de EvpP, que también interactúa entre ellas. Por último, no se requieren dos proteínas EvpD y EvpJ para la secreción dependiente de T6SS. Lo que indica posibles interacciones con tres proteínas EVP (EvpA, EvpL y EvpN) (Zhen et al., 2007)

En el sistema T6SS de *E. piscicida*, se ha determinado que EvpP es un factor de virulencia muy importante, aunque su papel preciso en las interacciones de *E. piscicida* y macrófagos aún no está claro. Las bacterias que tienen atenuación de EvpP, producto de mutantes, se correlacionan con una mayor activación de los macrófagos, como se refleja en la producción aumentada de óxido nítrico (NO). EvpP podría ser un factor importante para controlar el destino de *E. piscicida* dentro de los macrófagos ya que regula la proteína ribosómica S5 (RPS5) (Qin et al., 2020). La EvpP confiere virulencia a *E. tarda* y esta hace parte del sistema T6SS, se necesitan más estudios para identificar los factores de virulencia que confieren a *E. anguillarum*.

Otros estudios demuestran que la hemolisina EthA regula productos extracelulares de citotoxicidad (ECPs) y es responsable de una mayor invasión de *E. tarda*. EthA es importante para invadir, colonizar e infectar los peces a través de una actividad

hemolítica aumentada lo cual ayuda a la penetración de las capas de la mucosa y permite la supervivencia intracelular y ayuda a la propagación de *E. tarda* (Wang et al., 2012).

Adicional a los factores propios de las bacterias, se debe considerar en la patobiología de la edwardsielosis aquellos relacionados con el hospedero y el ambiente. En relación con el hospedero, se ha establecido que a partir del contacto del microorganismo con el ambiente acuático, el patógeno puede adherirse e invadir al pez por las vías IG e INM (intestino, piel y branquias) (Ling et al., 2001). Los ensayos de inoculación por INM en rodaballo (*Scophthalmus maximus*) y lenguado (*Solea solea*) con *E. tarda* mostraron que las cepas evaluadas poseen un elevado grado de virulencia por estas vías, ligeramente inferior al obtenido por la vía IP (Castro et al., 2012). Esta misma situación se presentó en nuestro estudio, tanto con *E. anguillarum* como con *E. tarda* se reprodujo la infección por las diferentes vías de inoculación (IP, IG e INM). Esto sugiere que existiría una amplia presencia de receptores en la tilapia para *Edwardsiella tarda* y *Edwardsiella anguillarum* en las diferentes superficies que tienen contacto con el ambiente.

También, el contacto de los peces con otros animales susceptibles a la edwardsielosis y/o reservorios de las bacterias, como aves piscívoras y/o carroñeras, juegan un papel importante en el mantenimiento de altas cargas bacterianas en el ambiente de cultivo (Winsor et al., 1981; Leotta et al., 2009; Miniero et al., 2018). Se ha descrito, que las altas temperaturas y alta carga de materia orgánica en el agua, facilitan el crecimiento exponencial de *E. tarda*, principalmente en aquellos cuerpos que reciben aguas servidas (Miniero et al., 2018; White et al. 1973).

El humano hace parte de la cadena endémica de la edwardsielosis. Se sabe que *E. tarda* es una bacteria zoonótica que infecta principalmente pacientes inmunocomprometidos (Javier, 2012). Es posible que *E. anguillarum* tenga un comportamiento patogénico similar, ya que crece hasta 40°C, por lo que sería infectiva en mamíferos, esto requiere posteriores estudios para ser confirmado (Oh et al., 2020).

Otro hallazgo importante de este estudio es la evidencia del efecto negativo en la ganancia de peso de los peces por la cronicidad de la edwardsielosis. Se observó una disminución en la ganancia de peso, estadísticamente significativa, de los peces sobrevivientes a los 30 días, inoculados con *E. anguillarum* y *E. tarda* en comparación con el grupo control (Figs. 9 y 10). En un animal enfermo, la tasa de crecimiento se ve significativamente disminuida, debido a que ingieren poco o ningún alimento y además invierten la energía en la formación de nuevos anticuerpos o mecanismos de defensa contra la enfermedad (Beamish et al., 1996). El objetivo de la acuicultura es optimizar el rendimiento productivo de los peces buscando la mayor ganancia de peso en equilibrio con los diferentes parámetros ambientales, zootécnicos y sanitarios. Como se demuestra en este estudio, las enfermedades crónicas, como la edwardsielosis, tienen un impacto negativo en el negocio, representado en la reducción de la ganancia de peso (Figs. 9 y 10). El rendimiento en tilapias depende de varios factores como el peso corporal, condición sexual, condición corporal y características morfométricas (Clement y Lovell, 1994; Souza y Maranhão, 2001; Rutten et al., 2004). Si la ración alimenticia solo cumple su función de mantenimiento durante la enfermedad crónica (compensando que el pez no gane ni pierda peso), la inversión en este rubro se pierde (Teoh et al., 2011). Otro análisis interesante de los resultados relacionado con el peso de los animales enfermos a los 30 días PI, es que a pesar de estar enfermos no perdieron peso, únicamente dejaron de ganar, lo que reitera la eficiencia de las tilapias como especies en los sistemas de producción animal.

Para finalizar, es probable que algunos brotes de enfermedad por *E. tarda* reportados antes del año 2015, cuando se realizó la reclasificación taxonómica de esta bacteria, correspondan a *E. anguillarum* sin que se haya podido identificar en ese momento, dado que las especies de *Edwardsiella* no pueden ser diferenciadas únicamente por sus características bioquímicas (Reichley et al., 2015; Oh et al., 2020). Se requiere para el diagnóstico de la edwardsielosis la evaluación del comportamiento clínico de los peces,

de las lesiones macroscópicas, microscópicas, aislamiento bacteriológico y la identificación molecular por amplificación del gen *gyrB*, para diferenciar la infección por *E. anguillarum* de las de otras *Edwardsiella* sp (Reichley et al., 2015). Además, teniendo en cuenta que las lesiones granulomatosas también pueden ser generadas por otros agentes patógenos en tilapia, como *Streptococcus agalactiae*, *Francisella noatunensis* y/o *Mycobacterium* sp. (Soto et al., 2009; Reichley et al., 2017), se requiere el análisis integral para confirmar el diagnóstico de edwardsielosis.

7 CONCLUSIONES

Se implementó un modelo *in vivo* de infección intragástrica (IG), intraperitoneal (IP) y por inmersión (INM) de *E. anguillarum* y *E. tarda* en alevinos de tilapia.

Con los resultados expuestos en la presente investigación observamos que *E. anguillarum* es una bacteria más patógena con respecto a *E. tarda*, presentando la primera mayor porcentaje de mortalidad, patogenicidad y virulencia, por la extensión y grado de lesión observadas por las diferentes vías de inoculación.

Las infecciones por *E. tarda* y *E. anguillarum* en peces que sobrevivieron hasta los 30 días PI, presentaron lesiones crónicas, disparidad en tamaño y reducción de la ganancia de peso, relacionándose esto con la baja ingesta de alimento y afectando los parámetros zootécnicos del cultivo.

Es importante tener en cuenta la valoración de hallazgos clínicos y lesiones a la necropsia en los peces, como se observó en este modelo experimental, ya que permiten percibir estados de enfermedad crónica en los peces, como sucede en *E. tarda* y *E. anguillarum*.

Los peces con enfermedad crónica pueden servir de fuente de infección para los peces sanos, jugando un papel importante en la presentación endémica de la enfermedad en granjas piscícolas.

El diagnóstico de la enfermedad debe ser integral, incluyendo la evaluación del comportamiento clínico de los peces, de las lesiones macroscópicas, microscópicas, aislamiento bacteriológico y la identificación molecular por amplificación del gen *gyrB*, para diferenciar la infección por *E. anguillarum*, *E. tarda* y las de otras *Edwardsiella* sp

Edwardsiellosis tanto por *E. tarda* como por *E. anguillarum* es una enfermedad de carácter crónico en los alevinos de tilapia, causando alteraciones en los parámetros productivos, como son la disminución de la ganancia de peso y a su vez la mortalidad, siendo esta mayor en *E. anguillarum* teniendo en cuenta su mayor patogenicidad.

8 RECOMENDACIONES

Implementar un sistema de monitoreo sanitario permanente que incluya la evaluación del comportamiento clínico de los alevinos de tilapia, de las lesiones macroscópicas (granulomas en bazo e hígado principalmente), microscópicas (infección granulomatosa sistémica), aislamiento bacteriológico y la identificación molecular por amplificación del gen *gyrB*, para diferenciar la edwardsielosis por *E. anguillarum*, *E. tarda* y las de otras *Edwardsiella* sp. Dicho monitoreo sanitario debe incluir la evaluación de otras enfermedades prevalentes en este grupo etario como son infección por TiLV, estreptococosis, aeromoniasis, flavobacteriosis, parasitismos, entre otros, con el fin de generar alarmas tempranas para la prevención y control de las patologías.

Continuar los estudios que permitan dilucidar genómica y patobiológicamente las divergencias entre factores de virulencia de *E. anguillarum* y *E. tarda*, para explicar las diferencias del cuadro clínico y así proponer estrategias de prevención y control

Evaluar la calidad microbiológica del agua del sistema de cultivo para conocer la dinámica poblacional de *Edwardsiella* sp. ambiental, de tal forma que se puedan tomar decisiones tempranas para controlar la carga bacteriana, como es realizar recambios de agua, reducir la materia orgánica, entre otros.

Incluir Edwardsielosis por *E. anguillarum* como diferencial de mortalidades agudas en alevinos de tilapia.

Seguir todas las indicaciones de bioseguridad presentes en la resolución 20186 del ICA.

La Edwardsielosis tiene impacto directo en la productividad de la granja, por lo que se recomienda establecer la vigilancia y seguimiento para evitar altas pérdidas económicas.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Abayneh T, Colquhoun D, Sorum H. *Edwardsiella piscicida* sp. Nov., a novel species pathogenic to fish. *J. Applied Microbiology*. 2012. 644-654.
2. Acevedo R., S. C. Bacterias resistentes a antibióticos en ecosistemas acuáticos. *Producción + Limpia*. 2015. Vol.10, No.2 - 160-172.
3. Al-Harbi A, Uddin N. Bacterial diversity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in brackish water in Saudi Arabia. *Aquaculture*. 2005. 250: 566-572.
4. Al-Harbi AH. Faecal coliforms in pond water, sediments and hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) in Saudi Arabia. *Aquaculture Research*. 2003. 34: 517-524.
5. Ali F, Hassan M, Saleha A, Siti K, Milud A. (2011). Pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* isolated from a fish in Selangor to Juvenile Red tilapia (*Oreochromis* sp.). *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2011. 10: 914-919. <http://doi:10.3923/javaa.2011.914.919>.
6. Andersson D, H. D. (2012). Evolution of antibiotic resistance at non-lethal drug concentrations. *Drug. Resist*, 15: 162– 172.
7. Armwood A, Camus A, López-Porras A, Ware C, Griffin M, Soto E. Pathologic changes in cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) associated with an outbreak of *Edwardsiella anguillarum*. *J. Fisch Diseases*. 2019. 1-7. doi:10.1111/jfd.13058
8. Austyn J, K.J. Wood. Principles of cellular and molecular immunology. Oxford University Press, Oxford. 1993.
9. Bacharach E., M. N. Characterization of a Novel Orthomyxo-like Virus Causing Mass Die-Offs of Tilapia. *MBio*. 2016. 1-7.
10. Balbuena O. Suplementación Energética-Proteica. *Revista Argentina de producción animal*. 2003. 20 (Supl. 1): 18-19.
11. Barato P, Griffin M, Pachón L, Montufar M, Yun S, Soto E. 8th International Symposium on Aquatic Animal Health. *Outbreak of edwardsiellosis for Edwardsiella anguillarum in farmed tilapia (Oreochromis sp.)*. 2018. Prince Edward Island, Canadá: International Symposium on Aquatic Animal Health.
12. Beamish F, Sitja-Bobadilla A, Jebbink, J, P.T.K. Woo. Bioenergetic cost of cryptobiosis in fish: rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* infected with *Cryptobia*

- salmositica* and with an attenuated live vaccine. *Diseases of Aquatic Organisms*. El Salvador. 1996. 25pp.
13. Bingle L, Bailey C. y Pallen M. Type VI secretion: A beginner's guide. *Curr. Opin. Microbiology*. 2008. 11(1): 3-8.
 14. Bong-Tae Kim., C. L.-H. Assessment on the vulnerability of Korean aquaculture to climate change. *Marine Policy*. 2019. Volume 99, Pages 111-122.
 15. Buján N, Mohammed H, Balboa S, Romalde J, Toranzo AE, Arias CR, et al. Genetic studies to re-affiliate *Edwardsiella tarda* fish isolates to *Edwardsiella piscicida* and *Edwardsiella anguillarum* species. . *Systematic and Applied Microbiology*. 2018. 41, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j>.
 16. Cala D. (09 de 05 de 2020). *World Aquaculture Society Meetings*. 2020. Obtenido de <https://www.was.org/Meetings/ShowAbstract.aspx?Id=109534>.
 17. Castro N, Toranzo A, Devesa S, González A, Nuñez S. First description of *Edwardsiella tarda* in Senegalese sole, *Solea senegalensis*(Kaup). *J. Fish Dis*. 2012. 35(1):79-82. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01325.x>
 18. Clement S. and T. Lovell. Comparison of processing yield and nutrient composition of cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*. 1994. 119: 299-310.
 19. Coles B. S. Isolation of *Edwardsiella tarda* from three Oregon sea mammals. *J. Wildl*. 1978.
 20. Custódio da Costa J, L. V. Extreme climate scenario and parasitism affect the Amazonian fish *Colossoma macropomum*. *Science of the Total Environment*. 2020. Volume 726, 15 July 2020, 138628.
 21. Deem S. Disease Risk Analysis in Wildlife Health Field Studies. En a. K. Cook R., *Emerging disease at the interface of people, domestic animals, and wildlife. Fowlers zoo and wild animal medicine current therapy*. 2012. (págs. 2- 7). Saunders.
 22. Earth policy. (27 de 05 de 2018). *Earth policy*. 2018. Obtenido de http://www.earth-policy.org/plan_b_updates/2013/update114
 23. Earth-policy. (26 de 04 de 2019). *Earth policy*. 2019. Obtenido de http://www.earth-policy.org/plan_b_updates/2013/update114
 24. Eknath AE, Doyle RW. Effective population size and rate of inbreeding in aquaculture of Indian major carps. *Aquacult*. 1990. 85:293–305.

25. Ewing W. M. *Edwardsiella*, anew genus of Enterobacteriaceae based on a new species, *E. tarda*. *Int. J. Syst.Evol. Microbiol.*1965.
26. Ewing W, Mcwhorter, A., Escobar, M., & Lubin, A. *Edwardsiella*, anew genus of Enterobacteriaceae based on a new species, *E. tarda*. *Int. J. Syst.Evol. Microbiol.*1965.
27. Eyngor M, Zamostiano R, Kembou JE, Berkowitz A, Bercovier H, Tinman S, et al. Identification of a novel RNA virus lethal to tilapia. *J. Clin. Microbiol.*2014. 52, 4137-4146. <https://doi: 10.1128/JCM.00827-14>.
28. FAO, FIDA, UNICEF, PMA, OMS. *El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo*. Fomentando la resiliencia climática en aras de la seguridad alimentaria y la nutrición. FAO, Roma: El Grupo de Edición de la Oficina de Comunicación Institucional de la FAO.2018.
29. FAO. (04 de 05 de 2019). *Resistencia a los antimicrobianos - intervención de FAO en la región*. 2019. Obtenido de <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2017/2017-cha-relavra-del-barrio-1-b.pdf>
30. FAO. (11 de 05 de 2019). 2019. Obtenido de <http://www.fao.org/3/CA2864EN/ca2864en.pdf>
31. FAO. (2004). Manejo sanitario y mantenimiento de la bioseguridad de los laboratorios de postlarvas de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) en América Latina. FAO Documento Técnico de Pesca. No. 450. Roma, FAO. 2004. 66
32. FAO., O. M. (15 de 05 de 2020). *El estado mundial de la acuicultura*. 2020. Obtenido de <http://www.fao.org/3/I9540ES/i9540es.pdf>
33. FEDEACUA. (02 de 05 de 2019). CARTILLA DE PRODUCTIVIDAD PARA TILAPIA ENCOLOMBIA. 2019. https://fedecua.org/wpcontent/uploads/2019/11/cartilla-de-productividad_.pdf
34. FEDEACUA. (14 de 05 de 2020). 2020. Obtenido de <https://fedecua.org/wp-content/uploads/2019/12/Presentacio%CC%81n-Comercio-Ext.-Pisci%CC%81cola-Ene-Mar-2019.pdf>
35. Figueiredo C, Carneiro O, Faria F, Costa G. *Streptococcus agalactiae* asociado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápiado-nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.2006. 58: 678-680.

36. Garcia N. et al. Edwardsiellosis, common and novel manifestations of the disease: a review. *Revista colombiana ciencia animal*. 2012.
37. Gibson-Corley K, Olivier A, Meyerholz D. Principles for Valid Histopathologic Scoring in Research. *Vet Path*. 2013. 50(6):1007-1015
38. González X. (09 de 05 de 2020). *Agronegocios*. 2020. Obtenido de <https://www.agronegocios.co/ganaderia/aquavac-strep-sa-la-primera-vacuna-para-tilapia-que-msd-salud-animal-trajo-al-pais-2753075#>
39. Grant S, Fisher E, Chang J, Mole B. y Dangl J. Subterfuge and manipulation: Type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annual Review of Microbiology*. 2006. 60: 425-449.
40. Griffin M, Wise D. *Edwardsiella piscicida* identified in the southeastern USA by *gyrB* sequence, species-specific and repetitive sequence-mediated PCR. *Dis Aquat Org*. 2014. Vol. 108: 23–35.
41. Griffin M, Greenway, T, & Wise D. *Edwardsiella* spp. In: Woo, P.T.K., Cipriano, R.C. (Eds.), *Fish viruses and bacteria: pathobiology and protection*. 2007. *CAB International, Boston*.
42. Grimont P, Grimont F, Richard C, & Sakazaki, R. *Edwardsiella hoshi-nae*, a new species of Enterobacteriaceae. *Curr. Microbiol*. 1980. 4, 347–351.
43. Hawke J, Mcwhorter A, Steigerwalt A, & Brenner, D. *Edwardsiella ictaluri* sp. nov., the causative agent of enteric septicemia of catfish. *Int. J.Syst. Evol. Microbiol*. 1981.
44. Huong N, Thuy H, Gallardo W, Thanh H. Bacterial population in intensive tilapia (*Oreochromis niloticus*) culture pond sediment in Hai Duong province, Vietnam. *International Journal of fisheries and aquaculture*. 2014. 6: 133-139.
45. Iregui C, et al. *First epidemiological map of the lesions and diseases of fish in Colombia*. 2004. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
46. Iregui C. Experimental early pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* infection in red tilapia *Oreochromis* spp. *Journal of Fish Diseases*. 2015. 1-11.
47. James S, Egna H, Chopin T, Peterson M, Cao L, et al. Responsible Aquaculture in 2050: Valuing local conditions and human innovations will be key to success. *Bioscience*. 2013. 63: 255-262. <https://doi.org/10.1525/bio.2013.63.4.5>.
48. Janda J, Abbott S. Infections associated with the genus *Edwardsiella*: the role of *Edwardsiella tarda* in human disease. *Clin Infect Dis*. 1993. 17: 742-8.

49. Javier S. Edwardsiellosis, an emerging zoonosis of aquatic animals. *Biohelikon: Immunity & Diseases*. 2012. 1(1)
50. Katharios P, Kokkari C, Dourala N, et al. First report of Edwardsiellosis in cage-cultured sharpsnout sea bream, *Diplodus puntazzo* from the Mediterranean. *BMC Vet Res*. 2015. 11, 155. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0482-x>
51. Katharios, P. Characterization of a Highly Virulent *Edwardsiella anguillarum* Strain Isolated From Greek Aquaculture, and a Spontaneously Induced Prophage Therein. *Frontiers in Microbiology*. 2019. 1-12. Obtenido de 10.3389/fmicb.2019.00141
52. Kebede, B. H. Isolation and identification of *Edwardsiella tarda* from Lake Zeway and Langano, Southern Oromia Ethiopia. 2016. *Fish. Aquac. J*.
53. Kibenge F.S.B. Determinants of Emergence of Viral Diseases in Aquaculture. En G. M. Kibenge F., *Aquaculture Virology*. 2016. (págs. 95-116). Academic Press.
54. Kou S.C., Chung H.Y. & Kou G.H. Studies on artificial infection of the gliding bacteria in cultured fishes. *Fish Pathology*. 1981. 15, 309–314.
55. Lee S.W, Wendy W. Antibiotic and heavy metal resistance of *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda* isolated from red hybrid tilapia (*Oreochromis spp.*) coinfecting with motile *aeromonas* septicemia and edwardsiellosis. *Veterinary World*. 2017. 10(7): 803-807.
56. Leotta G.A, Piñeyro P, Serena S, Vigo GB. Prevalence of *Edwardsiella tarda* in Antarctic wildlife. *Polar Biol*. 2009. 32:809-812.
57. Leung, K. S. Edward-siella tarda — virulence mechanisms of an emerging gastroenteritis pathogen. 2012. *Microbes Infect*.
58. Ling, S.H., Wang, X.H., Xie, L., Lim, T.M. & Leung, K.Y. Use of green fluorescent protein (GFP) to study the invasion pathways of *Edwardsiella tarda* in in vivo and in vitro fish models. *Microbiology*. 2000. 146: 7-19.
59. Ling. S.H.M., Wang X.H., Lim T.M., Leung K.Y. Green fluorescent protein-tagged *Edwardsiella tarda* reveals portal of entry in fish. *FEMS Microbiol Letters*. 2001. 194: 239-243.
60. López-Porras A, Elizondo C, Chavez A, Camus A, Griffin M., et al. Application of multiplex quantitative Polymerase chain reaction methods to detect common bacterial fish pathogens in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, hatcheries in Costa Rica. *J World Aquacult*. 2018. 1-14. <https://doi.10.1111/jwas.12576>.

61. Lv Y, Xiao J, Liu Q, Wu H, Zhang Y, Wang Q. Systematic mutation analysis of two-component signal transduction systems reveals EsrA-EsrB and PhoP-PhoQ as the major virulence regulators in *Edwardsiella tarda*. *Vet. Microbiol.* 2012. 157. 190-199.
62. Lv Y, Yin K, Shao S, Wang Q, Zhang Y. Comparative proteomic analysis reveals new components of the PhoP regulon and highlights a role for PhoP in the regulation of genes encoding the F1F0 ATP synthase in *Edwardsiella tarda*. *Microbiology-SGM.* 2013. 159, 1340–1351.
63. Lv Y, Zheng J, Yang M, Wang Q, Zhang Y. An *Edwardsiella tarda* mutant lacking UDP-glucose dehydrogenase shows pleiotropic phenotypes, attenuated virulence, and potential as a vaccine candidate. *Vet. Microbiol.* 2012b. 160, 506–512.
64. Manrique, Wilson G et al. Inflamación crónica granulomatosa en el pez teleosteo *Piaractus mesopotamicus*: modelo de estudio histopatológico. *Rev.MVZ Cordoba.* 2017. Vol.22. (1).5738-5746. <http://dx.doi.org/10.21897/rmvz.933>.
65. Meyer, F. P, Bullock G. L. *Edwardsiella tarda*, a New Pathogen of Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). *APPLIED MICROBIOLOGY.* 1973. 155-156.
66. Miniero Davies Y, Xavier de Oliveira MG, Paulo Vieira Cunha M, Soares Franco L, Pulecio Santos SL, Zanolli Moreno L, Túlio de Moura Gomes V, Zanolli Sato MI, Schiavo Nardi M, Micke Moreno A, Becker Saidenberg A, Rose Marques de Sá L, Knöbl T. *Edwardsiella tarda* outbreak affecting fishes and aquatic birds in Brazil, *Veterinary Quarterly.* 2018. 38(1), 99-105.
67. Mohanty, B. S. Edwardsiellosis in fish: a brief review. *J. Biosci.* 2007.
68. Montufar M., P. L.-G. Epidemiologic Assessment and DNA Sequencing of TiLV from Colombian Tilapia Farms using Motif Fingerprints. En A. S. Fisheries (Ed.), *8th International Symposium on Aquatic Animal Health.* 2018. (pág. 62). Prince Edward Island: American Society of Fisheries.
69. Mota L. y Cornelis G. The bacterial injection kit: Type III secretion systems. *Annals of Medicine.* 2005. 37(4): 234-249.
70. Muratori M.C, Martins, N.E, Peixoto M.T et al. *Edwardsiella* septicemia mortality in tilapia-integrated with pig in fish farming. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2001. v53, p.658-662.
71. Nguyen N. P. Environmental conditions influence susceptibility of striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage) to *Edwardsiella ictaluri*. *Aquaculture.* 2020. Volume 523, 1-7.

72. OECD. (11 de 05 de 2019). *Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test*. 2019. Obtenido de <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264069961>.
73. OECD. (11 de 05 de 2019). *Test No. 215: Fish Juvenile Growth Test*. 2019. Obtenido de https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-215-fish-juvenile-growth-test_9789264070202-en.
74. Oh W, Jun J, Kim H, et al. Characterization and Pathological Analysis of a Virulent *Edwardsiella anguillarum* Strain Isolated From Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Korea. *Frontiers in Veterinary Science*. 2020. 7:14. Jan 28. <https://doi:10.3389/fvets.2020.00014>.
75. Pacha R.E. y Ordal E.J. Epidemiology of columnaris disease in salmon. *Bacteriological Proceedings*. 1963. 63, 3–4.
76. Pakingking Jr.R, Takano R, Nishizawa T, Mori K, Iida Y, Arimoto M, Muroga K. Experimental coinfectin with Aquabirnavirus and Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) *Edwardsiella tarda* or *Streptococcus iniae* in Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Pathology*. 2003. 38(1):15-21.
77. Park S, Aoki T, Jung T. Pathogenesis of and strategies for preventing *Edwardsiella tarda* infection in fish. *VETERINARY RESEARCH*. 2012. 43-67.
78. Parrado Y. Historia de la Acuicultura en Colombia. *Revista científica de la Sociedad Española de Acuicultura*. 2012. 60-77. http://www.revistaaquatic.com/aquatic/pdf/37_9.pdf.
79. Pavanelli GC, Eiras JC, Takemoto RM. Doenças depeixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. Maringá, Brazil: EDUEM. 1998. p. 259.
80. Piñeros R, Griffin M, et al. IMMUNOHISTOCHEMISTRY TO CHARACTERIZE OUTBREAKS OF *Edwardsiella anguillarum*-ASSOCIATED EDWARDSIELLOSIS IN FARMED TILAPIA (*Oreochromis* SP.) IN COLOMBIA. *LAQUA 18 Latin American & Caribbean Aquaculture 18* 2018. (pág. 319). Bogotá: LAQUA.
81. Pradeep P, Suebsing, R, Sirthammajak S, Kampeera J, Jitrakorn S, Saksmerprome, et al. Evidence of vertical transmission and tissue tropism of Streptococcosis from naturally infected red tilapia (*Oreochromis* spp.). *Aquaculture Reports*. 2016. 3, 58–66.
82. Pretto-Giordano L, Eckehard-Müller E, De Freitas J, Gomes da Silva V. Evaluation of the pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2010. 53: 87-92. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132010000100011>.

83. Qin L, Wang X, Gao Y, Bi K and Wang W. Roles of EvpP in *Edwardsiella piscicida*-Macrophage Interactions. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020. 10:53. doi: 10.3389/fcimb.2020.00053.
84. Reed, L. M. A simple method of estimating fifty per cent end points. *American Journal of Hygiene.* 1938. 493–497.
85. Reichley S, Ware C, Steadman J, Gaunt P, García J, LaFrenz B, et al. Comparative Phenotypic and Genotypic Analysis of *Edwardsiella* Isolates from Different Hosts and Geographic Origins, with Emphasis on Isolates Formerly Classified as *E. tarda*, and Evaluation of Diagnostic Methods. *Clinical Veterinary Microbiology.* 2017. 3466-3491. doi:10.1128/JCM.00970-17
86. Reichley S, Ware C, Greenway T, Wise D, Griffin M. Real-time polymerase chain reaction assays for the detection and quantification of *Edwardsiella tarda*, *Edwardsiella piscicida*, and *Edwardsiella piscicida*-like species in catfish tissues and pond water. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 2015. Vol. 27(2) 130–139. <https://doi.org/10.1177/1040638714566672>
87. Reichley S. R. Comparative susceptibility of channel catfish, *Ictalurus punctatus*; blue catfish, *Ictalurus furcatus*; and channel, ♀)× blue (♂) hybrid catfish to *Edwardsiella piscicida*, *Edwardsiella tarda*, and *Edwardsiella anguillarum*. *Journal of the World Aquaculture Society.* 2018. 49, 197–204. <https://doi.org/10.1111/jwas.12467>.
88. Rondón-Barragán I, Ramírez-Duarte W., Gutiérrez G, Eslava-Mocha P. Edwardsiellosis en tilapia. En: *Memorias XIII Jornada de Acuicultura*, Instituto de Acuicultura de los Llanos, Universidad de los Llanos. 2007. 84-88.
89. Rondón-Barragán I, Ramírez-Duarte W, Gutiérrez G, Eslava-Mocha P. Edwardsiellosis en tilapia. En: *Memorias XIII Jornada de Acuicultura*, Instituto de Acuicultura de los Llanos, Universidad de los Llanos. 2007. Pág. 84-88.
90. Rutten M.J, H. Bovenhuis and H. Komen. Modeling fillet traits based on body measurements in three Nile tilapia strains (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture.* 2004. 231:113-122.
91. Sechter M, Shmilovitz G, Altmann R, Seligmann B, Kretzer I, et al. *Edwardsiella tarda* isolated in Israel between 1961 and 1980. *Journal of Clinical Microbiology.* 1983. 17(4): 669-671.
92. Shanthakumar SP, Duraisamy P, Vishwanath G, Selvanesan BC, Ramaraj V, Vasantharaj D. Broad spectrum antimicrobial compounds from the bacterium *Exiguobacterium mexicanum* MSSRFS9. *Microbiol.* 2015. Res;178: 59-65. doi: 10.1016/j.micres.2015.06.007.

93. Shao S, Lai Q, Liu Q, Wu H, Xiao J, Zhang Y, et al. Phylogenomics characterization of a highly virulent *Edwardsiella* strain ET080813T encoding two distinct T3SS and three T6SS gene clusters: propose a novel species as *Edwardsiella anguillarum* sp. Nov. Syst Appl Microbiol. 2015. 38:36–47. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.10.008>
94. Shrivastava S. y Mande S. Identification and functional characterization of gene components of Type VI secretion system in bacterial genomes. PLoS ONE. 2008. 3(8): e2955.
95. SIOC. (03 de 02 de 2020). *Sistema de Información de Gestión de Organizaciones de Cadenas-Minagricultura*. 2020. Obtenido de <https://sioc.minagricultura.gov.co/Acuicultura/Pages/default.aspx>.
96. Snieszko SF. History and present status of fish diseases. J Wildl Dis. 1975. 11: 446-459.
97. Soto E, Hawke J, Fernandez D. Attenuation of the fish pathogen *Francisella* sp. By mutation of the iglC gene. J Aquatic Animal Health. 2009a 21, 140-149.
98. Soto E, Hawke J, Fernandez D, Morales J. *Francisella* sp., an emerging pathogen of tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Costa Rica. J Fish Disease. 2009b 32, 713–722.
99. Soto, E., Griffin, M., Arauz, M., Riofrio, A. M., & Cabrejos, M. (2012). *Edwardsiella ictaluri* as the causative agent of mortality in cultured Nile tilapia. *J. Aquat. Anim. Health*.
100. Souza M, Maranhão T. Rendimento de carcaça, filé e subprodutos da filetagem da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L), em função do peso corporal. Acta Scientiarum. 2001. 23(4): 897-901.
101. Teoh C, Turchini G, Wing-Keon N. Erratum to “Genetically improved farmed Nile tilapia and red hybrid tilapia showed differences in fatty acid metabolism when fed diets with added fish oil or a vegetable oil blend” Aquaculture. 2011. 316: 144-154. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.03.021
102. Thangapalam J, Praskash K, Harresh A, Sayani B. Pathology of *Edwardsiella tarda* infection in African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell 1822), fingerlings. Arch. Pol. Fish. 2015. 23: 141-148.

103. Ucko M, Colorni A, Dubytska L, and Thune RL. *Edwardsiella piscicida*-like pathogen in cultured grouper. *Dis. Aquat. Organ.* 2016. 121, 141–148. doi: 10.3354/dao03051.
104. Vadstein O, Berghm O, Gatesoupe FJ, Galindo-Villegas J, Mulero V, Picchiatti S, et al. Microbiology and immunology of fish larvae. *Rev Aquacult.* 2013. 5 (Suppl. 1) S1–S25. 10.1111/j.1753-5131.2012.01082.x.
105. Vallejo AN, Miller NE, Harvey MA, Cuchens GW, Warr LW. Cellular pathway(s) of antigen processing and presentation in fish APC: endosomal involvement and cell-free antigen presentation. *Dev. Comp. Immunol.* 1992. 3:51-65.
106. Verjan G. N, I. C. Edwardsiellosis, common and novel manifestations of the disease: A review. *Revista Colombiana de Ciencia Animal.* 2012. 82-90.
107. Villamil L, Esguerra D. *Enterococcus, Myroides Y Exiguobacterium: GÉNEROS BACTERIANOS CON POTENCIAL PROBIÓTICO PARA EL CULTIVO DE TILAPIA NILÓTICA (Oreochromis niloticus).* *Acta Biológica Colombiana.* 2017. Vol. 22, Núm.3.
108. Wang I.K., K. H. Extraintestinal manifestations of *Edwardsiella tarda* infection. *Int. J. Clin.* 2005. Pages 917-921.
109. Wang X, Wang Q, Xiao J, Liu Q, Wu H, Xu L, Zhang Y. *Edwardsiella tarda* T6SS component evpP is regulated by esrB and iron, and plays essential roles in the invasion of fish. *Fish and Shellfish Immunology.* 2009. 27 (3):469-477.
110. Wang X, Yan M, Wang Q, Ding L, & Li F. Identification of *Edwardsiella tarda* isolated from duck and virulence genes detection. *African Journal of Microbiology Research.* 2012. 6(23), 4970-4975.
111. Wang Q, Yang M, Xiao J, Wu H, Wang X, Lv Y, Xu L, Zheng H, Wang S, Zhao G, Liu Q, Zhang Y. Genome sequence of the versatile fish pathogen *Edwardsiella tarda* provides insights into its adaptation to broad host ranges and intracellular niches. 2009. PLoS ONE 4, e7646.
112. Wang Y, Zhang X.-H, Lu J, Xu Z, Chen J, Han Y. Isolation of *Edwardsiella tarda* from diseased turbot (*Scophthalmus maximus*) and vaccination against *Edwardsiella tarda*. *J. Fish. Sci. Chin.* 2009. 3, 394–403.
113. White F., S. C. Isolation of *Edwardsiella tarda* from aquatic animal species and surface waters in Florida. 1973. *J. Wildl. Dis.*

114. White E. *Edwardsiella tarda*. In: Hoff, G.L., Frye, F.L., Jacobson, E.R.(Eds.). *Diseases of amphibians and reptiles*, Plenum Press, New York. 1984. pp. 83–92.
115. Winsor DK, Bloebaum AP, Mathewson JJ. Gram-negative, aerobic, enteric pathogens among intestinal microflora of wild turkey vultures (*Cathartes aura*) in west central Texas. *Applied and Environmental Microbiology*. 1981. 42, 1123-1124.
116. Wonmongkol P, Sukhavachana S, Ampolsak K, Srisapoome P, Suwanasopee T, Poompuang S. Genetic parameters for resistance against *Flavobacterium columnare* in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *Journal of Fish Diseases*. 2017. 321-328.
117. Xu T, Zhang XH. *Edwardsiella tarda*: an intriguing problem in aquaculture. *Aquaculture*. 2014. 431:129–135.
118. Ye X, Li J, Lu M, et al. Identification and molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolated from pond-cultured tilapia in China. *Fisheries Science*. 2011. 77: 623-632. <https://doi.org/10.1007/s12562-011-0365-4>
119. Zapata A, Diez B, Cejalvo T, Gutierrez-De Frias C, Cortés A. Ontogeny of the immune system of fish. *Fish Shell fish Immunology*. 2006. 20, 126-136.
120. Zheng J, & Leung KY. Dissection of a type VI secretion system in *Edwardsiella tarda*. *Molecular Microbiology*. 2007. 66(5), 1192–1206. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05993>.

10 ANEXOS

ANÁLISIS BIOLOGÍA MOLECULAR - Detección del genoma del Virus de la Tilapia del Lago (TiLV)

Registro interno Corpavet	ID Lote	Tipo de muestra	Resultado análisis molecular	Carril fotografía
CM-19-0261	Investigación	Pool	NEGATIVO para la detección de ARN TiLV	261



Datos del método
Agente: Virus de la Tilapia del Lago - TiLV
Técnica: Amplificación de ácidos nucleicos por reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)
Referencia: Eyngor et al., 2014 (J Clin Microbiol)

M: Marcador de peso molecular
P: Control positivo N: Control negativo

Anexo 1. RT-PCR para el segmento 3 del Virus de la Tilapia del Lago – TiLV – CM-19- 0261 – Carril 261 de larvas al momento de la llegada para evaluación de su estado sanitario.

ANÁLISIS BIOLOGÍA MOLECULAR - Detección del genoma de *E. tarda*

Registro interno Corpavet	ID Lote	Tipo de muestra	Resultado análisis molecular	Carril fotografía
CM-19-0262	Investigación	<i>Pool</i>	NEGATIVO para la detección de DNA de <i>E. tarda</i>	262



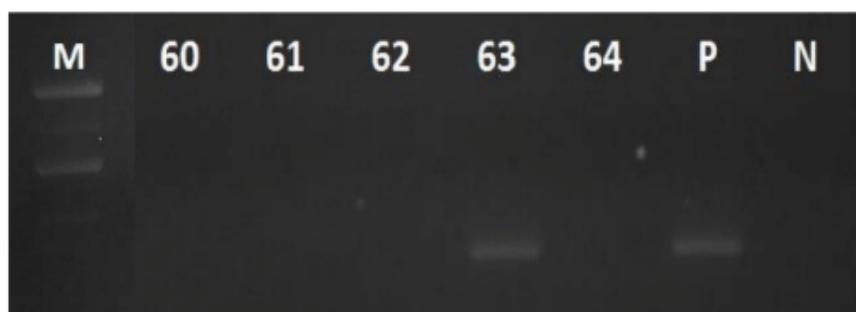
Datos del método
Agente: <i>Edwardsiella tarda</i>
Técnica: detección del gen <i>gyrB</i> por amplificación de ácidos nucleicos en PCR
Referencia: Reichley et al., 2015

M: Marcador de peso molecular
P: Control positivo **N:** Control negativo

Anexo 2. PCR convencional para detección del gen *gyrB* de *E. tarda* CM-19- 0262 – Carril 262 de larvas al momento de la llegada para evaluación de su estado sanitario.

ANÁLISIS BIOLOGÍA MOLECULAR - Detección del genoma de *E. anguillarum*

Registro interno Corpavet	ID Lote	Tipo de muestra	Resultado análisis molecular	Carril fotografía
CMN-19-260	CM-19-343	<i>Bacteriología</i>	NEGATIVO para la detección de DNA de <i>E. anguillarum</i>	60
CMN-19-261	CM-19-345	<i>Bacteriología</i>	NEGATIVO para la detección de DNA de <i>E. anguillarum</i>	61
CMN-19-262	CM-19-347	<i>Bacteriología</i>	NEGATIVO para la detección de DNA de <i>E. anguillarum</i>	62
CMN-19-263	CM-19-351	<i>Bacteriología</i>	POSITIVO para la detección de DNA de <i>E. anguillarum</i>	63
CMN-19-264	CM-19-352	<i>Bacteriología</i>	NEGATIVO para la detección de DNA de <i>E. anguillarum</i>	64



Datos del método
Agente: <i>Edwardsiella anguillarum</i>
Técnica: detección del gen <i>gyrB</i> por amplificación de ácidos nucleicos en PCR
Referencia: Reichley et al., 2015

M: Marcador de peso molecular
P: Control positivo N: Control negativo

Anexo 3. PCR convencional para detección del gen *gyrB* de *E. anguillarum* – CM-19-0343 - Carril 60 de larvas al momento de la llegada para evaluación de su estado sanitario.