

Efectos individuales de la cichlidogiriasis y estreptococosis inducidas en la bioquímica sanguínea de la tilapia *Oreochromis niloticus*

Individual effects of cichlidogiriasis and streptococosis induced on the blood biochemistry of tilapia *Oreochromis niloticus*

Juan José Sandoval-Gío^{1,3}, Miguel Rosado-Vallado² y Rossanna Rodríguez-Canul¹

¹Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) Unidad Mérida, Carretera Antigua a Progreso Km. 6, A. P. 73 Cordemex, Mérida, Yucatán, 97310. México

²Facultad de Química. Universidad Autónoma de Yucatán. Calle 41 No. 421 x 26 y 28. Mérida, Yucatán, 97150. México

³Instituto Tecnológico de Tizimín. Final Aeropuerto Cupul s/n. Apartado Postal No. 79, Tizimín, Yucatán, 97700. México
e-mail: jsandoval29@hotmail.com

Sandoval-Gío J. J., M. Rosado-Vallado y R. Rodríguez-Canul. 2013. Efectos individuales de la cichlidogiriasis y estreptococosis inducidas en la bioquímica sanguínea de la tilapia *Oreochromis niloticus*. *Hidrobiológica* 23 (3): 328-339.

RESUMEN

En este estudio se propone evaluar la posibilidad de utilizar los datos de la bioquímica sanguínea como diagnóstico presuntivo de un proceso infeccioso en tilapias *Oreochromis niloticus*, mediante infecciones inducidas por *Streptococcus* sp. o por la activación de la respuesta inmune inducida por antígenos de *Cichlidogyrus* spp. Específicamente, se evaluó la variabilidad de algunos metabolitos de la bioquímica sanguínea de tilapias *O. niloticus*, desafiadas de manera individual con inyecciones intraperitoneales (IP) de cultivos celulares de *Streptococcus* sp. (Grupo STREP, $n = 10$) y extractos tisulares de *Cichlidogyrus* spp. (Grupo C-EXP, $n = 10$). Adicionalmente, a 10 tilapias, se les inyectó búfer salino de fosfato (PBS) (pH = 7), para ser usados como control de inmunizaciones (Grupo solución salina, SS). Además, 70 tilapias se mantuvieron en condiciones acuaculturales usuales y conformaron el grupo línea base (LB). Diez peces más, libres de infección, sirvieron como control negativo (Grupo CN). La bioquímica sanguínea (metabolitos e iones), se analizó por el método de microplaca. Los resultados mostraron que no hubo diferencias entre los grupos LB y CN ($p > 0.05$). En los peces STREP y C-EXP se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de glucosa, proteínas totales, albúmina y globulinas al compararlos con los peces LB ($p < 0.05$). Asimismo, el colesterol, calcio y cloro variaron significativamente en los peces STREP ($p > 0.05$). Para esta especie y en las condiciones de cultivo establecidas, las variaciones producidas por la infección con *Streptococcus* sp. y los antígenos de *Cichlidogyrus* spp., modificaron algunos parámetros de su bioquímica sanguínea, los cuales pueden servir como indicadores de posibles patologías infecciosas.

Palabras clave: Bioquímica sanguínea, *Cichlidogyrus* spp., microplaca, *Streptococcus* sp., tilapia.

ABSTRACT

In this study, we propose to evaluate the blood biochemistry as diagnosis technique of a pathologic process in tilapias *Oreochromis niloticus* by means of infections induced by *Streptococcus* sp. or by the activation of the immune response induced by antigens of *Cichlidogyrus* spp. Specifically, variations of some metabolites from the blood biochemistry were evaluated in experimentally infected tilapia *Oreochromis niloticus*. The organisms were intraperitoneally challenged (IP) with individual antigenic extracts of *Streptococcus* sp. (STREP Group, $n = 10$) and *Cichlidogyrus* spp. (C-EXP Group, $n = 10$), respectively, while 10 other tilapia were inoculated with a saline solution buffer (SS Group) and

were used as immunization control. Another group of 70 tilapias was maintained in aquaculture conditions included the baseline group (LB). The negative control (CN) included 10 fish free of infection. The blood chemistry (metabolites and ions) were tested in a microplate format. No differences were observed between the LB and the CN groups ($p > 0.05$). Only fish injected with *Streptococcus* sp. (STREP) and *Cichlidogyrus* spp. (C-EXP) were significantly different with the values of glucose, total proteins, albumin, and globulins, when comparing with LB fish ($p < 0.05$). Furthermore, the cholesterol, calcium and the chlorine changed significantly in the STREP fish ($p > 0.05$). The results from the induced infections with *Streptococcus* sp. and *Cichlidogyrus* spp., respectively, modified some parameters of the blood biochemistry of tilapia that could be used for some preliminary diagnosis of infectious diseases.

Key words: Blood biochemistry, *Cichlidogyrus* spp., microplate, *Streptococcus* sp., tilapia.

INTRODUCCIÓN

La tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757), representa una fuente alternativa de proteína animal de comprobada calidad en países en desarrollo, debido entre otros aspectos, a que posee una tasa óptima de crecimiento-reproducción y tolera altas densidades de siembra. Estas condiciones han promovido un carácter intensivo de su cultivo, lo que en ocasiones desmejora su manejo y la vuelven susceptible a adquirir enfermedades infecciosas (Kabata, 1985). En la actualidad, dos de los patógenos que más afligen a los cultivos de tilapia, son los estreptococos y los monogéneos del género *Cichlidogyrus* spp., que, en distintos grados de severidad, han llegado a ocasionar mortandades en los cultivos (Popma & Masser, 1999; Shoemaker *et al.*, 2001).

La enfermedad estreptocócica ocasiona anualmente pérdidas millonarias a los acuacultores de tilapia en todo el mundo, causando hasta el 50% de detrimento de la producción en estanques. Las manifestaciones clínicas incluyen letargo, pérdida de apetito y hemorragias de órganos internos (Chen *et al.*, 2003; Pulido *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2009). Estos signos son semejantes a los que se presentan en otras enfermedades como la producida por *Enterococcus* sp. o la septicemia hemorrágica bacteriana, por lo que el diagnóstico oportuno y certero es una prioridad (Martins *et al.*, 2008). *Cichlidogyrus* spp. ocasiona daños severos en branquias de tilapias cultivadas, especialmente cuando la abundancia parasitaria es alta (~800 monogéneos por pez). La transmisión parasitaria entre hospederos, se favorece por el ciclo de vida directo del patógeno, calidad del agua poco atendida y prácticas de manejo inadecuado, que generan una situación que requiere de una detección rápida y efectiva, antes de recurrir a tratamientos costosos (Prieto, 1987; Bondad-Reantaso & Arthur, 1990; Paperna, 1991; Jiménez-García *et al.*, 2001).

Los métodos de detección habituales de estos dos agentes infecciosos incluyen a la microbiología convencional, así como la microscopía óptica y el estudio histológico de los arcos branquiales de los peces, respectivamente (Austin & Austin, 1989; Paperna, 1991). No obstante, en sanidad acuícola, se promueve el diagnóstico oportuno antes de tener que recurrir a tratamientos que incrementan riesgos y costos de los acuacultores. Así, con la necesidad de contar con diagnósticos expeditos, económicos

y utilizados de manera rutinaria, diversos autores (Grayson *et al.*, 1991; Al-Harbi *et al.*, 2000; Klesius *et al.*, 2000; Rubio-Godoy *et al.*, 2004; Figueiredo *et al.*, 2005; Pasnik *et al.*, 2005), han propuesto técnicas usadas en medicina humana o veterinaria, que poseen fundamentos inmunológicos o de biología molecular, que han resultado útiles para la detección de patógenos en organismos acuáticos; sin embargo, una desventaja de tales análisis es que emplean reactivos de alto costo y difícil accesibilidad (Chen *et al.*, 2003). Una alternativa viable por su bajo costo y disponibilidad de equipo es la bioquímica sanguínea. Esta metodología ha funcionado para determinar variaciones en la concentración de diversos metabolitos séricos de organismos bajo situaciones de estrés por patógenos, así como por la presencia de tóxicos o debido a desórdenes nutricionales (Hrubec & Smith, 1999; Chen *et al.*, 2003; Silveira-Coffigny *et al.*, 2004; Manera & Britti, 2006; Fanouraki *et al.*, 2007).

En este sentido, la estandarización de las pruebas bioquímicas para determinar metabolitos y/o iones en suero o plasma de vertebrados distintos a los humanos, como peces, anfibios, reptiles y aves, tienen el mismo fundamento de aquéllas utilizadas en diagnóstico clínico humano e incluso veterinario/pecuario, ya que tienen la capacidad de establecer la concentración del metabolito/electrolito a analizar, en muestras sanguíneas (Kakuta & Namba, 1989; Jung *et al.*, 2003; Bailone *et al.*, 2010).

El objetivo de este estudio fue analizar la bioquímica sanguínea de tilapias infectadas individualmente con extractos antigénicos de *Streptococcus* sp. y *Cichlidogyrus* spp. para conocer las variaciones específicas del hospedero en respuesta a la infección de cada patógeno. Estos cambios podrían ser de utilidad para los acuacultores que monitorean sus estanques en la búsqueda de patógenos en etapas sub clínicas y antes de desencadenarse mortandades difíciles de controlar. Para lograr parámetros de comparación confiables y establecer las variaciones correspondientes, se contó con datos de tilapias *O. niloticus*, libres de infección y en condiciones habituales de cultivo (línea base) para contrastarlos con los peces sometidos a las infecciones provocadas (Silveira-Coffigny *et al.*, 2004). Asimismo, con el objetivo de aumentar la reproducibilidad del análisis, se implementó la técnica de microplaca de 96 pocillos como soporte físico

y un lector análogo de densidades ópticas para la valoración de los sueros.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de peces y mantenimiento. 300 tilapias *Oreochromis niloticus* de 19 ± 4 cm de longitud total (LT); 169 ± 46 g de peso (P), sin signos de enfermedad, ni distinción de sexo, se mantuvieron en condiciones habituales de cultivo por 30 días en estanques de concreto de 3 m de diámetro y 1.2 m de altura de columna de agua, en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) Unidad Mérida, Yucatán. A los peces se les suministró alimento comercial (40% proteína) *ad libitum*. Transcurrido este tiempo, 100 peces se seleccionaron al azar y se colocaron en cuatro tinajas redondas de fibra de vidrio de 1000 litros cada una en un lugar cerrado y ventilado, con suministro de aire constante (ver abajo conformación de grupos). La captura de los organismos se realizó con redes de mano (2.5 cm de luz de malla), procurándose provocar a cada pez el mínimo de estrés por manipulación. La temperatura y el oxígeno disuelto en el agua de las tinajas se monitorearon diariamente con un oxímetro digital (YSI 550) y se tomaron muestras de agua cada semana para análisis de pH, amonio y nitrito (Eaton *et al.*, 1998), manteniéndose dentro de los rangos establecidos ($T^{\circ} = 25 \pm 5$ °C, $O_2 = 5.87 \pm 0.76$ mg/L, pH: 6.9 ± 0.8 ; amonio = 0.079 ± 0.018 mg/L; nitrito: 2.87 ± 1.40 mg/L).

Conformación de grupos. Los peces se dividieron de la siguiente manera (Tabla 1):

Grupo Estreptococosis inducida (STREP). 10 tilapias se infectaron intraperitonealmente (IP) con un cultivo celular de *Streptococcus* sp. de acuerdo a lo descrito en la Tabla 1.

Grupo Ciclidogiriasis experimental (C-EXP). 10 tilapias fueron inmunizadas IP con un extracto de *Cichlidogyrus* spp. (Tabla 1).

Grupo solución salina (SS). Como control de inmunizaciones, a 10 peces se les administró solución amortiguadora salina estéril (búfer salino de fosfato, PBS), vía IP (Tabla 1).

Grupo control línea base (LB). Setenta tilapias, sin tratamiento experimental alguno y en condiciones acuaculturales usuales sirvieron para catalogar la línea base del CINVESTAV y se analizaron *post-mortem* para coleccionar monogéneos que sirvieron para preparar la fuente de antígeno que se inocularía a las tilapias del grupo experimental C-EXP.

Grupo control negativo (CN). Diez tilapias con una ausencia total de infección por *Streptococcus* sp. y *Cichlidogyrus* spp., obtenidas de un cultivo experimental libre de patógenos donados por la Universidad de Stirling (Escocia, Reino Unido), los cuales se mantuvieron en el área de cuarentena del CINVESTAV durante tres meses.

Preparación del inóculo de *Streptococcus* sp. Las bacterias del género *Streptococcus* se aislaron del tracto vaginal de pacientes gestantes del Hospital Regional "Ignacio Medina Téllez" de Mérida, Yucatán. Se cultivaron en medio para estreptococos fecales de Kenner KF (Sigma) y se incubaron en baño María a 28°C durante 24 horas. Después, el medio de cultivo se retiró por centrifugación y las células bacterianas se lavaron tres veces con PBS estéril, pH 7.2. Los microorganismos se confirmaron hasta género, como *Streptococcus* sp. con un 99.5% de similitud, realizando procesos de inoculación/incubación por 24-48 horas en un analizador mini API 20Strep (Biomérieux). Para preparar el inóculo, se realizaron diluciones del cultivo en forma seriada en tubos de infusión corazón-cerebro (BHI) (Sigma) hasta ajustarse a una densidad óptica (DO) de 1.0 a 540 nm. Esto se logró hasta alcanzar una concentración de 5×10^7 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml con una dilución 1:10 (Shelby *et al.*, 2001).

Preparación del antígeno de *Cichlidogyrus* spp. Para preparar el extracto que se inoculó a los peces del grupo C-EXP, alrededor de 8000 monogéneos (~1.6 g) se aislaron de las branquias de un número indeterminado de tilapias provenientes de los estanques del CINVESTAV IPN, Unidad Mérida (incluidas las del grupo LB), a los cuales se les diagnosticó con ciclidogiriasis por métodos parasitológicos. Las especies de *Cichlidogyrus* identificadas mediante microscopía óptica fueron *C. sclerosus* Paperna *et* Thurston, *C.*

Tabla 1. Esquema metodológico realizado en la determinación de la bioquímica sanguínea de *O. niloticus*, en respuesta a infecciones experimentales de *Streptococcus* sp. y *Cichlidogyrus* spp.

| Grupo | LT | P | D | APM | S | TS |
|-------|------------|--------------|---------------------------|-----|----|--|
| STREP | 18 ± 6 | 154 ± 64 | SÍ (3 veces cada 15 días) | SÍ | SÍ | Antes de D1, D2, D3 y 15 días después D3 |
| C-EXP | 18 ± 3 | 173 ± 31 | SÍ (3 veces cada 15 días) | NO | SÍ | Antes de D1, D2, D3 y 15 días después D3 |
| SS | 19 ± 2 | 145 ± 44 | SÍ (3 veces cada 15 días) | NO | SÍ | Antes de D1, D2, D3 y 15 días después D3 |
| LB | 20 ± 3 | 196 ± 41 | NO | SÍ | SÍ | Una sola vez, antes APM |
| CN | 17 ± 3 | 166 ± 18 | NO | SÍ | SÍ | Una sola vez, 3 meses después cuarentena |

LT: Longitud total (cm); P: Peso (g); D: Desafío; APM: Análisis *post-mortem*; S: Sangrado; TS: Tiempos de sangrado.

GRUPOS, STREP: Desafíados con *Streptococcus* sp.; C-EXP: Desafíados con *Cichlidogyrus* spp.; SS: Inoculados con solución salina; LB: Línea base; CN: Control negativo.

tilapiae Paperna, *C. dossui* Paperna y *C. longicornis* Paperna et Thurston. Sin embargo, dado que independiente de la especie, estos organismos producen ciclidogiriasis, no se clasificaron hasta el nivel de especie, sino que en su lugar se trabajó con el género (Jiménez-García *et al.*, 2001). Para preparar el extracto antigénico se necesitó una buena cantidad de proteína por lo que posteriormente, los parásitos se colocaron en viales y se lavaron dos veces con ~ 1.5 mL de PBS estéril y frío (pH 7.2, 0.01 M). Luego se colocaron en un tubo Eppendorf y se centrifugaron tres veces a 13,000 *g* durante 5 minutos. Entonces, se adicionó 0.5 ml de PBS estéril, macerando manualmente con ayuda de una punta de plástico estéril. Posteriormente, el tubo se introdujo en un contenedor con nitrógeno líquido y se le agregó proteinasa K (20 µg/µl) para propiciar la ruptura de tejidos. El homogeneizado se centrifugó dos veces a 14,000 *g* por 30 minutos y el sobrenadante (extracto proteico) se separó del sedimento (cutícula) y ambos se almacenaron a una temperatura de -70 °C hasta su uso (Sandoval-Gío *et al.*, 2008).

Protocolo de infección e inmunizaciones. El procedimiento de infección (*Streptococcus*) e inmunización (*Cichlidogyrus*) para los peces de los grupos STREP y C-EXP, respectivamente, consistió en tres inoculaciones vía IP, sin administración de anestésicos, con un intervalo de dos semanas entre cada inoculación, según los esquemas siguientes (Tabla 1):

Grupo STREP. Los diez peces del grupo STREP fueron inoculados IP con 100 µl de un cultivo celular de *Streptococcus* sp. con una concentración de 5×10^7 CFU/ml en PBS estéril, con adyuvante completo de Freund (FCA), en proporción 1:1. A los 14 y 28 días se aplicó una segunda y tercera inoculación, respectivamente, con la misma concentración bacteriana pero adicionada con adyuvante incompleto de Freund (FIA, 50 µl), de acuerdo al protocolo establecido por Harlow y Lane (1988). Dos semanas después de la última inoculación, los peces se sacrificaron para extracción del corazón, riñón craneal, hígado y cerebro para realizar el cultivo reaislado del patógeno.

Grupo C-EXP. Los diez peces se inyectaron IP con 150 µl del extracto de *Cichlidogyrus* spp. (1 µg/µl) en FCA (1:1) y para las siguientes dos inoculaciones, la inyección consistió en igual concentración del extracto del parásito + FIA (50 µl) (Sandoval-Gío *et al.*, 2008).

Grupo SS: como control de inmunización, diez peces se inocularon 3 veces cada 14 días, con 150 µl de PBS estéril, respectivamente.

Colecta de muestras sanguíneas y obtención de suero. Los peces bajo el protocolo de infección o inmunización se sangraron cuatro veces (inmediatamente antes de cada inoculación antigénica y 15 días después de la última inoculación, respectivamente) (Tabla 1). A su vez, los peces del control negativo (CN), se sangraron solo en una ocasión, después de tres meses de cuarentena. Por

su parte, las tilapias LB, se sangraron también una sola vez, antes de ser sacrificadas para la colecta de monogéneos. La sangre obtenida de la vena caudal (~1 a 5 ml) se colocó en tubos Eppendorf a temperatura ambiente, dejándola coagular durante 30 minutos y centrifugándola a 1500 *g* por 10 minutos. El suero obtenido se colocó en tubos Eppendorf en alícuotas de 200 µl para congelarse a -20° C, para su posterior análisis (Sandoval-Gío *et al.*, 2008).

Determinación de la bioquímica sanguínea (metabolitos y iones) en suero por la técnica de microplaca. Las variables hematológicas (bioquímica sanguínea) se determinaron usando los estuches diagnósticos de varios proveedores (Tabla 2). Estas variables se clasificaron como METABOLITOS (glucosa, colesterol, proteínas totales, albúmina, globulinas, ácido úrico, urea, creatinina, bilirrubina total) e IONES (calcio, cloro, magnesio, fósforo). El protocolo general consistió en el uso de microplacas de policarbonato (Sigma) de 96 pocillos, probando previamente la cantidad de reactivo (R), solución estándar (E) y muestra (M), que permitió la mayor maniobrabilidad durante la aplicación de la técnica. De acuerdo a estos ensayos preliminares, la cantidad de R se estableció en 200 µl para todas las pruebas; las cantidades de E y de M a probar fueron siempre equivalentes y se obtuvieron mediante la proporción sugerida para cada protocolo. Para el análisis de las muestras de *O. niloticus*, se colocó la cantidad de R en cada pocillo de la placa, seguida de E y M. Posteriormente, las placas se incubaron a temperatura ambiente en micro agitadores circulares, durante 10 a 30 minutos, dependiendo del análisis. A continuación, se colocó cada placa en un espectrofotómetro de ELISA (Dynex, MRX) para la lectura de las densidades ópticas (DO), a las longitudes de onda propuestas por los protocolos respectivos (Tabla 2). Cada prueba se realizó por triplicado. Los cálculos para cada determinación se realizaron conforme a cada kit diagnóstico, con previa obtención de curvas de calibración, obteniéndose la precisión y exactitud de cada una de las metodologías (coeficientes de variación < 3% y errores relativos, en las unidades respectivas de cada protocolo < 4%). Como excepción, el análisis de la albúmina se obtuvo por sustracción de la concentración de las globulinas de las proteínas totales. Los resultados para cada metabolito e ion, correspondientes a los cuatro tiempos de sangrado de los peces sometidos a inoculaciones (STREP, C-EXP, SS), se presentaron como el valor promedio de esos análisis. En el caso de los peces LB y CN, los valores expresados son el resultado de determinaciones únicas.

Análisis estadístico. A los valores de la concentración de cada metabolito o ion se les aplicó un análisis de normalidad Wilk Shapiro. En caso de no cumplir con criterios de normalidad, en los parámetros se aplicó un logaritmo natural (ln + 1) para estabilizar la varianza. Los valores obtenidos se compararon mediante un diseño unifactorial desbalanceado (DUD), ya que el número de tratamientos fue diferente. Las diferencias entre medias se analizaron mediante el método de LSD, por medio del programa Statistics 6.0, resultando las diferencias con $p < 0.05$, consideradas estadísticamente significativas.

Tabla 2. Descripción de las pruebas para determinación de metabolitos e iones en el suero de *Oreochromis niloticus*, sometidos a inoculaciones experimentales de *Streptococcus* sp. y *Cichlidogyrus* spp. y grupos control.

| | Tipo de determinación - Método | Cantidad reactivo (μ l) | Cantidad estándar-muestra (μ l) | Marca comercial | Referencia |
|--------------------|--|------------------------------|--------------------------------------|------------------|------------------------------|
| Metabolitos | | | | | |
| Glucosa | Colorimétrico. Trinder | | | | |
| | Glucosa oxidasa-peroxidasa | 200 | 2 | SPIN REACT | Trinder (1969) |
| Colesterol | Colorimétrico. Enzimático | 200 | 2 | STANBIO | Finley <i>et al.</i> (1978) |
| | Colesterol esterasa | | | | |
| Proteínas totales | Colorimétrico. Biuret | 200 | 5 | SPIN REACT | Koller & Kaplan (1989) |
| Albúmina | Colorimétrico. Verde Bromocresol | 200 | 1 | SPIN REACT | Doumas <i>et al.</i> (1971) |
| Globulinas | Sustracción | ----- | ----- | ----- | Kingsley (1939) |
| Ácido úrico | Enzimático colorimétrico Trinder | 200 | 4 | STANBIO | Fossati <i>et al.</i> (1980) |
| Urea | Enzimático colorimétrico Berthelot | 200 | 2 | SPIN REACT | Kaplan (1984) |
| Creatinina | Enzimático colorimétrico Punto final | 200 | 10 | STANBIO | Slot (1965) |
| Bilirrubina total | Colorimétrico. Diazo de Ehrlich. Punto final | 200 | 2 | STANBIO | Shull <i>et al.</i> (1980) |
| Iones | | | | | |
| Calcio | Colorimétrico. o-Cresolftaleína | 200 | 4 | SPIN REACT | Farell (1984) |
| Cloro | Colorimétrico. Tiozianato de mercurio | 200 | 1.5 | TECO Diagnostics | Wu (2006) |
| Magnesio | Colorimétrico. Calmagita. | 200 | 2 | ByoSystems | Wu (2006) |
| Fósforo | Colorimétrico Fosfomolibdato. | 200 | 2 | ByoSystems | Muñoz <i>et al.</i> (1983) |

RESULTADOS

Los valores obtenidos de los metabolitos y iones en los distintos grupos de peces se muestran en la Tabla 3. En primera instancia, los resultados en los análisis de los peces de línea base (LB) y control negativo (CN), no mostraron diferencias significativas entre sí ($p > 0.05$). Asimismo, en el estudio del desafío en los peces inoculados se observó:

Grupo STREP. El nivel de glucosa para STREP fue mayor (~176), en comparación con los peces de los grupos LB y CN (~100 y 92 mg/dl, respectivamente) ($p < 0.05$) (Tabla 3). Por otro lado, el colesterol fue menor en los peces STREP (~177 mg/dl), en comparación con LB y CN (210 y 213 mg/dl, respectivamente) ($p > 0.05$). A su vez, la determinación de la concentración de proteínas totales (PT), también resultó con variaciones significativamente mayores para los peces STREP (5.4 g/dl), en comparación con el grupo de línea base LB (3.6 g/dl) y el grupo CN (3.3 g/dl) ($p < 0.05$). Las globulinas fueron más altas también (3 g/dl), en comparación con LB y CN (1.9 g/dl) ($p < 0.05$).

En el caso de los iones, el calcio en los peces STREP tuvo valores de ~10 mg/dl por debajo de los grupos LB y CN (entre 12 y 14 mg/dl) ($p > 0.05$). El cloro sérico también fue significativamente menor (~103 mEq/L) al de los de peces LB: ~131 y CN: ~124 mEq/L ($p > 0.05$).

Grupo C-EXP. Para C-EXP se observó una disminución de la glucosa (~61) en comparación con los peces LB y CN (~100; 92 mg/dl, respectivamente) ($p < 0.05$). (Tabla 3). Por su parte, el colesterol en el grupo C-EXP (~207 mg/dl), no tuvo diferencias significativas al compararlo con LB y CN ($p < 0.05$). En contraste, las PT fueron mayores en C-EXP (6.1 g/dl, respectivamente) en comparación con LB (3.6 g/dl) y CN (3.3 g/dl) ($p < 0.05$). Los niveles de globulinas también fueron más altos, 3.6 g/dl, en comparación con 1.9 g/dl de LB y CN ($p < 0.05$).

Grupo SS. Los peces SS tuvieron diferencias significativas en la glucosa (~58 mg/dl) con respecto a LB y CN ($p < 0.05$) y además alcanzaron un valor cercano a los 275 mg/dl de colesterol sérico, muy por encima de los valores de los demás grupos

Tabla 3. Concentración de metabolitos e iones (valor promedio) en peces de *Oreochromis niloticus* del grupo control y de los lotes bajo el protocolo de infección. Los valores con superíndices iguales en una misma fila no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

| | Peces inmunizados | | | | |
|---------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | STREP | C-EXP | SS | LB | CN |
| Metabolitos | | | | | |
| Glucosa (mg/dl) | 175.9 ^c | 61.1 ^b | 58.4 ^b | 100.8 ^a | 92.0 ^a |
| Colesterol(mg/dl) | 177.1 ^b | 207.5 ^a | 274.4 ^c | 210.1 ^a | 213.5 ^a |
| Proteínas totales (g/dl) | 5.4 ^c | 6.1 ^d | 4.4 ^b | 3.6 ^a | 3.3 ^a |
| Albumina (g/dl) | 2.4 ^b | 2.5 ^b | 2.7 ^b | 1.7 ^a | 1.4 ^a |
| Globulinas (g/dl) | 3.0 ^b | 3.6 ^b | 1.7 ^a | 1.9 ^a | 1.9 ^a |
| Ácido úrico (mg/dl) | 4.2 ^a | 3.9 ^a | 8.1 ^b | 4.9 ^a | 3.8 ^a |
| Urea (mg/dl) | 4.6 ^a | 5.0 ^a | 5.1 ^a | 4.8 ^a | 4.6 ^a |
| Creatinina (mg/dl) | 0.3 ^a | 0.2 ^a | 0.3 ^a | 0.2 ^a | 0.2 ^a |
| Bilirrubina total (mg/dl) | 1.2 ^a | 1.0 ^a | 1.1 ^a | 1.0 ^a | 1.1 ^a |
| Iones | | | | | |
| Calcio (mg/dl) | 10.1 ^b | 12.9 ^a | 22.5 ^c | 14.1 ^a | 13.7 ^a |
| Cloro(mEq/L) | 103.3 ^b | 135.9 ^a | 157.2 ^c | 131.5 ^a | 124.6 ^a |
| Magnesio (mg/dl) | 2.3 ^a | 2.6 ^a | 3.5 ^b | 2.6 ^a | 2.4 ^a |
| Fósforo (mg/dl) | 4.9 ^a | 4.8 ^a | 4.6 ^a | 4.8 ^a | 4.4 ^a |

GRUPOS STREP: Desafiados con *Streptococcus* sp.; C-EXP: Desafiados con *Cichlidogyrus* spp.; SS: Inoculados con solución salina; LB: Línea base; CN: Control negativo.

(entre 177 Y 214 mg/dl) ($p < 0.05$). El grupo SS tuvo una PT de 4.4 g/dl, significativamente mayor que los grupos de referencia, pero las globulinas no variaron significativamente ($p < 0.05$) (Tabla 3). Con respecto al ácido úrico, los valores obtenidos para todos los grupos estudiados estuvieron entre 3.8 y 4.9 mg/dl, excepto los inoculados con solución salina (SS) que promedió 8.1 mg/dl. En el caso de los iones, el calcio presentó concentraciones significativamente distintas, en las tilapias SS, que aumentaron (~22 mg/dl) por encima de LB y CN (entre 12 y 14 mg/dl) ($p > 0.05$).

Por último, para todos los peces desafiados, la urea, creatinina y bilirrubina total (~4.6; ~0.2 y ~1 mg/dl, respectivamente), así como los valores de magnesio y fósforo (~2 y 4 mg/dl, respectivamente) no presentaron cambios relevantes en las situaciones experimentales propuestas ($p < 0.05$) (Tabla 3).

DISCUSIÓN

A la tilapia *Oreochromis niloticus* se le conoce como la especie acuacultural del siglo XXI, debido a su creciente demanda y excelente panorama de comercialización a nivel mundial (Fitzsimmons, 2000; Shelton & Popma, 2006; FAO, 2010). Esta actividad ha incorporado técnicas que buscan incrementar la producción por unidad de área, estrategia que ha aumentado las cosechas pero tiene la desventaja de que propicia un acrecentamiento en la

susceptibilidad de los peces para contraer diversos padecimientos. Esta situación ha obligado a realizar un monitoreo constante del cultivo mediante la implementación de técnicas diagnósticas, especialmente aquellas que sean capaces de evaluar periodos prepatentes de enfermedades, así como de detectar estados subletales de enfermedades, con el fin de prevenir mortalidades repentinas de los peces en los estanques (Sahu *et al.*, 1999).

Un método que resulta de utilidad, es la bioquímica sanguínea de los peces debido a su factibilidad de ejecución, fácil reproducción y a la disponibilidad de reactivos (Anderson & Barney, 1991; Yavuzkan Yildiz, 2009).

En este estudio se consideró tomar como referencia a dos grupos control, en primer lugar, los peces del CINVESTAV se mostraban saludables, con patrones de comportamiento y alimentación adecuados, por lo que constituyeron el patrón de comparación de organismos en condiciones acuaculturales o línea base (LB). Un aspecto que robusteció la elección de este subgrupo fue que los registros históricos de la calidad del agua de los estanques de CINVESTAV (2004-2011), se han mantenido dentro de los rangos sugeridos para la actividad acuícola (ver apartado de Materiales y Métodos, selección de peces y mantenimiento). Por otro lado, el Control Negativo (CN), se conformó con peces de línea genética pura, libres de ambos patógenos provenientes de un cultivo axénico de Stirling, Reino Unido.

La pertinencia de utilizar a los peces de los grupos LB y CN como control de referencia, se evidenció al encontrar que los valores de todos los metabolitos e iones no mostraron diferencias significativas entre sí, avalándolos su buen estado de salud (Tabla 3).

La estreptococosis en peces es considerada una patología emergente de importancia global por el Centro para la Prevención y Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC, por sus siglas en inglés). En tilapias, este padecimiento es causado por *Streptococcus iniae* Pier *et* Madin y *S. difficile* Eldar, con manifestaciones clínicas análogas entre sí, lo que ha redundado en un diagnóstico confuso de la enfermedad (Eldar *et al.*, 1995; Weinstein *et al.*, 1997; Romano & Mejía, 2003). Aún más, en años recientes *S. agalactie* Lehmann and Neumann, ha sido motivo de preocupación ya que se demostró que una vez aislado de casos clínicos de neonatos enfermos, causaron mortalidad en *Oreochromis niloticus* (Evans *et al.*, 2009). No obstante las diferencias ultraestructurales entre estas especies de *Streptococcus*, todas producen estreptococosis. Así, en este estudio, los peces se inocularon con un cultivo celular de *Streptococcus* sp. (Grupo STREP), que demostró su viabilidad al crecer en cultivos re aislados de agar, sin embargo, su inoculación experimental en los peces, no mostró signos clínicos de la enfermedad, ni se observó mortalidad (Austin & Austin, 1989; Madigan *et al.*, 2000).

Para el grupo STREP, los cambios más notorios se originaron en las determinaciones de glucosa, colesterol, calcio y cloro, séricos, respectivamente. Diversos autores (Hrubec *et al.*, 2000; Bittencourt *et al.*, 2003; Karasu Benli & Yavuzcan Yildiz, 2004; Manera & Britti, 2006; Mauel *et al.*, 2007), sitúan los valores basales de glucosa en tilapias y otros teleósteos en un rango de ~30 hasta ~100 mg/dl. Así, el valor de este metabolito para los peces sometidos a la estreptococosis inducida (STREP) fue significativamente más alto (~176 mg/dl) en comparación con los peces LB y CN, que se ubicaron dentro de los rangos señalados en la literatura (Tabla 3).

Los niveles de glucosa sérica en organismos acuáticos pueden variar como consecuencia de diversos factores intrínsecos como la talla, estado nutricional o reproductivo y estrés, siendo este último aspecto, el parámetro fisiológico más sensible (Smith, 1991; Fivelstad *et al.*, 1995; Barreto & Volpato, 2006). Para el presente estudio, todos los peces provenían de una misma cohorte, con un patrón de alimentación similar, por lo que el incremento de glucosa observado en los peces STREP, pudo deberse únicamente a la tensión producida por algún proceso concomitante a la inoculación de la bacteria.

Estudios registrados en *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) sometidos a estrés debido a un tratamiento quimioterapéutico con formalina, demostraron que los niveles de glucosa alcanzaron valores significativamente mayores (hasta 119 mg/dL) en com-

paración con peces en estado basal (~ 57 mg/dL) (Kakuta *et al.*, 1991). Otras investigaciones en otras especies de teleósteos, han revelado que bajo un estado de estrés agudo, ocurre una rápida elevación en los niveles de glucosa (hasta ~150 mg/dL), correspondiente a un incremento de la concentración de cortisol, entre 30, 60 y hasta 120 minutos después de la presencia del agente estresor (McGeer *et al.*, 1991; Kebus *et al.*, 1992; Cnaani *et al.*, 2004). Esta hiperglicemia se produce por el efecto de la liberación de catecolaminas, sustancias que determinan la glicogenólisis hepática en peces óseos (Barcellos *et al.*, 2001).

La ubicación de los valores de glucosa en las otras tilapias desafiadas de esta investigación (C-EXP y SS), dentro del rango establecido por la literatura, sugiere que el protocolo de inoculación IP no resultó estresante para los peces, o al menos no se manifestó en el tiempo estudiado. En este sentido, la variación significativa de la concentración de glucosa en el grupo STREP con respecto a los peces LB y CN, pudiese significar un indicador preliminar que deba atenderse como criterio diagnóstico, en peces que estuviesen en riesgo de enfermedad estreptocócica y en un estado pre patente.

A su vez, el nivel de colesterol obtenido para los peces STREP disminuyó hasta ~ 177 mg/dl, en contraste con los grupos LB y CN, que guardaron similitud con los basales reportados por otros autores para *O. niloticus* y otras especies de teleósteos (valores entre ~200 y 275 mg/dl) (Yavuzcan Yildiz *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2003; Manera & Britti, 2006; Atencio-García *et al.*, 2007). El colesterol sérico ha estado asociado a la capacidad de resistencia a enfermedades en diversas especies de peces y el estado de madurez sexual o la tasa de alimentación también pueden influir en su cinética de respuesta (Groff & Zinkl, 1999). En los peces de este estudio, se pretendió que las condiciones de madurez sexual no ejercieran influencia en los resultados, ya que se encontraban en la misma etapa reproductiva. Hrubec *et al.* (2000) y Cnaani *et al.* (2004), encontraron valores de colesterol de ~ 170 mg/dl en tilapia, como resultado del uso de peces híbridos y bajo estrés por hipoxia, respectivamente. Así, los valores de colesterol en los peces STREP de este estudio por debajo de 180 mg/dl para *O. niloticus*, podrían estar indicando un posible mecanismo de reacción frente a la infección inducida de *Streptococcus* sp.

En referencia a las proteínas totales (PT), en los peces STREP estos valores alcanzaron 5.4 g/dl, significativamente mayores que en LB y CN, los cuales se conservaron entre 3.3 y 3.6 g/dl, guardando similitud con los obtenidos por otros autores para esta misma especie y otros peces óseos (Hrubec *et al.*, 2000; Bittencourt *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2003; Manera & Britti, 2006). La concentración de proteína está fuertemente relacionada con situaciones de defensa específica contra patógenos, por lo que al detectarse un incremento significativo en las PT de los peces inoculados con el cultivo celular de estreptococos, pudiera deducirse de manera indirecta que existió una reacción específica

por parte del hospedero frente a la infección inducida bacteriana, aunque para comprobarlo se necesitaría de pruebas de mayor especificidad y sensibilidad, como el ELISA (Pasnik *et al.*, 2005).

En cuanto a los iones, el calcio decreció significativamente en los peces inoculados con el cultivo celular de *Streptococcus* (~10 mg/dl), en comparación con los peces LB y CN (~14 mg/dl). Nuestros peces de referencia tuvieron valores de este electrolito coincidentes con otros registros para *O. niloticus* y otras especies de peces óseos en condiciones acuaculturales usuales (Hrubec *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004; Manera & Britti, 2006). A este respecto, se sugiere que este electrolito posee alto nivel de correlación con la disponibilidad de calcio ambiental, por ejemplo, la dureza del agua de los estanques (Hrubec *et al.*, 2000). La península de Yucatán se caracteriza por poseer niveles elevados de dureza total (250 mg/l de sales disueltas, especialmente de CaCO₃), originados por la naturaleza cárstica del subsuelo (Pacheco-Ávila *et al.*, 2004). Hrubec *et al.* (2000), encontraron 31 mg/dl de calcio en *O. niloticus* mantenidos en alta densidad y Cnaani *et al.* (2004), hallaron 63 mg/dl en su congénere *O. aureus* (Steindachner, 1864). Tomando en cuenta que el agua de abastecimiento para el presente estudio, fue el mismo para todos los grupos de peces, es posible que este decremento en el calcio de los peces STREP (~10 mg/dl) sea un indicador preliminar de la infección inducida por *Streptococcus*, ya que existen antecedentes que mencionan la reducción en la concentración sérica de este ion (~2 mg/dl de disminución) en carpas infectadas experimentalmente con *Pseudomona fluorescens* Migula, así como en tilapias inoculadas con *S. iniae* (Pier, 1976) (Yavuzcan Yildiz, 1998; Chen *et al.*, 2003).

Por otra parte, el cloro en STREP disminuyó hasta ~103 mEq/L, en comparación con la fluctuación entre ~125 y 132 mg/dl para los peces controles de este estudio, coincidentes con los valores de referencia para *O. niloticus*, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) y *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818) (Hrubec *et al.*, 2000; Sakamoto *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004; Manera & Britti, 2006). Se sabe que este ion puede decrecer cuando la temperatura alcanza niveles inferiores a las condiciones naturales de la especie (Yavuzcan Yildiz *et al.*, 1997). En nuestro estudio, las condiciones de temperatura se monitorearon constantemente, manteniéndose dentro de los rangos establecidos para el cultivo de *O. niloticus* (25 ± 5°C). Así, esta situación de disminución del cloro pudiera ser de potencial relevancia diagnóstica, ya que es análoga a las descritas por Barham *et al.* (1980) y Chen *et al.* (2004), para infecciones inducidas por *Streptococcus*, aunque en combinación con *Aeromonas* spp. y *Vibrio vulnificus* Farmer, respectivamente (~10 mEq/L de disminución). Estos últimos investigadores correlacionaron esta variación sanguínea con daño hepático y renal, en este sentido, aunque en nuestra investigación no se trazó como meta la evaluación histológica de órganos internos de los peces infectados, los cultivos reaislados en estos órganos dieron positivo a *Streptococcus* sp.

Con respecto a los peces con la ciclidogiriasis inducida, en este estudio se realizó una *imprompta* de los parásitos dado que la literatura señala que existen ocho especies de *Cichlidogyrus* que afectan a las tilapias (le Roux & Avenant-Oldewage, 2010). De éstas, en las instalaciones de CINVESTAV IPN Mérida se han registrado cinco, siendo la más abundante *C. sclerosus* Paperna *et* Thurston. Independientemente del género, todas causan ciclidogiriasis (Prieto, 1987; Vidal-Martínez *et al.*, 2002; Jiménez-García *et al.*, 2001). En este grupo de estudio, las determinaciones de proteínas totales-globulinas manifestaron mayor relevancia, porque aunque los niveles de glucosa fueron significativamente diferentes que los peces LB y CN, se ubicaron dentro de los rangos destacados por la literatura (Tabla 3). No así, las PT del grupo C-EXP alcanzaron el valor más alto de todos los grupos de estudio, sugiriendo una respuesta específica de anticuerpos, las proteínas involucradas en la inmunidad adaptativa (Barret, 1991). Así, niveles altos de proteínas totales del suero e incrementos correspondientes de globulinas, en especial las inmunoglobulinas (IgM), se asocian a una respuesta inmunológica adquirida en peces con capacidad de memoria y de respuesta específica (Margni, 1996). Sandoval-Gío *et al.* (2008), encontraron por ELISA un título de anticuerpos positivo en *O. niloticus* desafiados con un extracto antigénico de *Cichlidogyrus*, por lo que puede inferirse que el incremento de las PT en los peces C-EXP, fue un indicador indirecto de la estimulación antigénica experimental. El incremento concomitante en los niveles de albúminas y globulinas para estos mismos peces (Tabla 3), así como el nulo efecto del adyuvante, comprobado en un lote complementario de peces (datos no mostrados), refuerza esta suposición.

Por su parte, los peces desafiados con solución salina (SS) presentaron para la glucosa y colesterol, respectivamente, cambios significativos, en comparación con los controles, pero dentro de los rangos reportados por otros autores para *O. niloticus* y otras especies de teleósteos (glucosa, valores entre 30 y 60 mg/dl; colesterol, valores entre ~200 y 275 mg/dl) (Yavuzcan Yildiz *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2003; Manera & Britti, 2006; Atencio-García *et al.*, 2007). Una situación similar ocurrió con las PT (4.4 g/dl) que variaron significativamente con respecto a LB y CN, pero son similares a los indicados en la literatura para esta especie de pez y otras más de teleósteos (entre ~3 y 4.5 g/dl) (Hrubec *et al.*, 2000; Bittencourt *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2003; Manera & Britti, 2006). El ácido úrico no varió significativamente para los grupos estudiados (alrededor de 4 mg/dl), excepto los inoculados con solución salina (SS; 8.1 mg/l) ($p < 0.05$). Cnaani *et al.* (2004) realizaron un estudio comparativo entre varias especies de tilapias, encontrando para *O. niloticus* un valor de ácido úrico de ~2.5 mg/dl y de ~3.7 mg/dl para *O. aureus* y *O. mossambicus* (Peters, 1852). El ácido úrico es un producto del catabolismo de los ácidos nucleicos, en especial de aquellos cuya base de nucleótidos están formados por la purina, por lo que se ha sugerido que un incremento en los registros de nitrógeno no protéico, pudiera originarse de mecanismos deri-

vados del rompimiento muscular (McKee, 2003). En este punto se podría deducir que el procedimiento de la inoculación antigénica incrementó el ácido úrico en el grupo SS, pero puesto que los peces STREP y C-EXP no manifestaron cambio alguno en la concentración de ese electrolito, esta variación pudo deberse más a un desequilibrio de tipo osmótico, dada la naturaleza de la sustancia inoculada (búfer salino de fosfato) (Zaki *et al.*, 2008).

Los demás metabolitos estudiados (urea, creatinina, bilirrubina) en *O. niloticus* de nuestro estudio, no presentaron variaciones significativas entre los grupos estudiados y se mantuvieron en los rangos establecidos por diversos autores, para la tilapia y otras especies de peces óseos (Tabla 3) (Hrubec *et al.*, 2000; Sakamoto *et al.*, 2001; Cnaani *et al.*, 2004, Manera & Britti, 2006). Asimismo, aunque significativamente superiores que los demás peces del presente estudio, los registros del cloro en SS, no se apartaron de los establecidos en el rango de otras especies de *Oreochromis* spp. (~135 - 160 mg/dl) (Papoutsoglou *et al.*, 2001; Cnaani *et al.*, 2004).

Por último, los peces de los grupos experimentales (STREP, C-EXP y SS) no mostraron diferencias significativas en la concentración de magnesio y fósforo con respecto a las tilapias LB y CN ($p < 0.05$). Además, estos iones ocurrieron dentro del intervalo basal descrito por otros autores para la tilapia (2.3-3.5 mg/dl) y (4.4-4.9 mg/dl), respectivamente (Hrubec *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2004; Cnaani *et al.*, 2004).

En conclusión, este trabajo conforma un primer intento para destacar el uso de la bioquímica sanguínea, para evidenciar el efecto de una infección inducida por estreptococos en tilapias. En este sentido, el incremento significativo de la concentración de glucosa en el grupo STREP con respecto a los peces controles pudiese significar un parámetro que deba atenderse como criterio diagnóstico, en peces que estuviesen en riesgo de enfermedad estreptocócica, sin presentar signos clínicos de la patología. Esto, en conjunto con decrementos en los niveles de colesterol, calcio y cloro, pudieran ser indicadores preliminares de prevalencias iniciales de estreptococos en tilapias cultivadas. Se sugiere reforzar estos resultados con organismos en etapas clínicas de la infección para robustecer nuestros hallazgos. De igual manera, los niveles de los diversos metabolitos y iones estudiados para los grupos LB y CN, resultaron dentro de los rangos destacados en la literatura para *O. niloticus*, lo que permitió confirmarlos como línea de control y referencia. Asimismo, la utilización de la técnica de microplaca, se propone como herramienta diagnóstica para determinar la bioquímica sanguínea permitiendo disminuir la cantidad de reactivo utilizado y aumentar el número de muestras para procesar en un tiempo cada vez, lo que sugiere una reducción de la inversión económica y optimización de la relación horas/hombre para el trabajo de laboratorio. Aun así, su accesibilidad para cualquier laboratorio de diagnóstico acuícola no puede garantizarse *per se*, dada la inversión para la obtención

del lector de microplacas (Anderson & Barney, 1991; Shelby *et al.* 2001).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es un extracto de la tesis doctoral de J. J. Sandoval-Gío, apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con la beca 209205 y registro 129336. Se agradece al Q.F.B. Juan Antonio Pérez Vega su apoyo técnico en la implementación de la técnica de microplaca.

REFERENCIAS

- AL-HARBI, A. H., R. TRUAX & R. L. THUNE. 2000. Production and characterization of monoclonal antibodies against tilapia *Oreochromis niloticus* immunoglobulin. *Aquaculture* 188 (3-4): 219-227
- ANDERSON, D. P. & P. J. BARNEY. 1991. The role of the diagnostic laboratory in fish disease control. *Annual Review of Fish Diseases* 1: 41-62.
- ATENCIO-GARCÍA, V., F. GENES-LÓPEZ, D. MADARIAGA-MENDOZA & S. PARDO-CARRASCO. 2007. Hematología y química sanguínea de rubio (*Salminus affinis* Pisces: Characidae) del río Sinú. *Acta Biológica Colombiana* 12S: 27-40.
- AUSTIN B. & D. A. AUSTIN. 1989. *Methods for the Microbiological Examination of Fish and Shellfish*. Ellis Horwood, Chichester, 317 p.
- BAILONE, R. L., M. L. MARTINS, J. L. P. MOURIÑO, F. N. VIEIRA, F. S. PEDROTTI, G. C. NUNES & B. C. SILVA. 2010. Hematology and agglutination titer after polyvalent immunization and subsequent challenge with *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Archivos de Medicina Veterinaria* 42 (3): 221-227.
- BARCELLOS, L. J. G., V. M. WOHL, G. F. WASSERMANN, R. M. QUEVEDO, I. ITZÉS & M. H. KRIEGER. 2001. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish. *Aquaculture Research* 32 (2): 121-123.
- BARHAM, W. T., G. L. SMIT & H. J. SCHOONBEE. 1980. The haematological assessment of bacterial infection in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology* 17 (3): 275-281.
- BARRET, J. T. 1991. *Inmunología médica*. Editorial Interamericana, México, 346 p.
- BARRETO R. E. & G. L. VOLPATO. 2006. Stress response of the fish Nile tilapia subjected to electroshock and social stressors. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 39 (12): 1605-1612.
- BITTENCOURT N. L., L. MOLINARI, D. SCOARIS, R. PEDROSO, C. NAKAMURA & T. UEDANAKAMURA. 2003. Haematological and Biochemical Values for Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* Cultured in SemiIntensive System. *Acta Scientiarum. Biological sciences* 25 (2): 38-59.
- BONDAD-REANTASO, M. G. & J. R. ARTHUR. 1990. The parasites of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) in the Philippines, including an analysis

- of changes in the parasite fauna of cultured tilapia from fry to marketable size. *In: Proceedings of 2nd Asian Fisheries Forum*. Tokyo, Japan, pp. 729-734.
- CHEN, C.Y., G. A. WOOSTER, R. G. GETCHELL, P. R. BOWSER & M. B. TIMMONS. 2003. Blood chemistry of healthy, nephrocalcinosis-affected and ozone-treated tilapia in a recirculation system, with application of discriminant analysis. *Aquaculture* 218 (1-4): 89-102.
- CHEN, C. Y., G. A. WOOSTER & P. R. BOWSER. 2004. Comparative blood chemistry and histopathology of tilapia infected with *Vibrio vulnificus* or *Streptococcus iniae* or exposed to carbon tetrachloride, gentamicin, or copper sulfate. *Aquaculture* 239 (1-4): 421-443.
- CNAANI, A., S. TINMAN, Y. AVIDAR, M. RON & G. HULATA. 2004. Comparative study of biochemical parameters in response to stress in *Oreochromis aureus*, *O. mossambicus* and two strains of *O. niloticus*. *Aquaculture Research* 35 (15): 1434-1440.
- DOUMAS B. T., W. A. WATSON & H. G. BIGGS. 1971. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clinica Chimica Acta* 31 (1): 87-96.
- EATON, A. D., L. S. CLESCERI & A. E. GREENBERG (Eds.). 1998. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20th Ed. American Public Health Association (APHA). Washington, D.C. 1325 p.
- ELDAR A., P. F. FRELIER, L. ASANTA, P.W. VARNER, S. LAWHON & H. BERCOVIER. 1995. *Streptococcus shiloi*, the name for an agent causing septicemic infection in fish, is a junior synonym of *Streptococcus iniae*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45 (4): 840-842.
- EVANS, J.J., P.H. KLESIOUS, D.J. PASNIK & J.F. BOHNSACK. 2009. Human *Streptococcus agalactiae* Isolate in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Emerging Infectious Diseases* 15 (5): 774-776.
- FANOURAKI, E., P. DIVANACH & M. PAVLIDIS. 2007. Baseline values for acute and chronic stress indicators in sexually immature red porgy (*Pagrus pagrus*). *Aquaculture* 265 (1-4): 294-304.
- FAO. 2010. El estado mundial de la pesca y la acuicultura-2010 (Roma, Italia). Disponible en línea en <http://www.fao.org/docrep/013/i1820s/i1820s00.htm> (consultado el 16 de enero de 2012).
- FARELL, E. C. 1984. Calcium. *In: Kaplan L. A. & A. J. Pesce (Eds.). Clinical chemistry: theory, analysis, and correlation*, 2nd edition. The C.V. Mosby Co., St Louis, pp. 1051-1255 and 418.
- FIGUEIREDO, H. C. P., P. H. KLESIOUS, C. R. ARIAS, J. EVANS, C. A. SHOEMAKER, D. J. PEREIRA JR. & M. T. D. PEIXOTO. 2005. Isolation and characterization of strains of *Flavobacterium columnare* from Brazil. *Journal of Fish Diseases* 28 (4): 199-204.
- FINLEY P. R., R. B. SCHIFMAN, R. J. WILLIAMS & D. A. LICHTI. 1978. Cholesterol in high-density lipoprotein: use of Mg²⁺/dextran sulfate in its enzymic measurement. *Clinical Chemistry* 24 (6): 931-933.
- FITZSIMMONS, K. 2000. Tilapia: The most important aquaculture species in the 21st Century. *In: Fitzsimmons K. & J. Carvalho (Eds.). Tilapia Aquaculture in the 21st century: Proceedings from the Fifth International Symposium on Tilapia Aquaculture*. Rio de Janeiro, September 3-7. pp. 3-8
- FIVELSTAD, S., J. SCHWARZ, H. STRØMSNES & A. BERIT OLSEN. 1995. Sublethal effects and safe levels of ammonia in seawater for Atlantic salmon postsmolts (*Salmo salar* L.) *Aquacultural Engineering* 14 (3): 271-280.
- FOSSATI, P., L. PRENCIPE & A. BERTI. 1980. Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/ 4 aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine *Clinical Chemistry* 26 (2): 227-231.
- GRAYSON, T. H., P. G. JENKINS, A. B. WRATHMELL & J. E. HARRIS. 1991. Serum response to the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* (Kroyer, 1838) in naturally infected salmonids and immunised rainbow trout *Onchorhynchus mykiss* (Walbaum) and rabbits. *Fish and Shellfish Immunology* 1 (2): 141-155.
- GROFF, J. M. & J. G. ZINKL. 1999. Hematology and clinical chemistry of cyprinid fish. Common carp and gold fish. *Veterinary Clinics of North America: Exotic animal practice*. California 2 (3): 741-776.
- HARLOW, E. & D. LANE. 1988. *Antibodies, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 726 p.
- HERNÁNDEZ, E., J. FIGUEROA & C. IREGUI. 2009. Streptococcosis on a red tilapia, *Oreochromis* sp., farm: a case study. *Journal of Fish Diseases* 32 (3): 247-252.
- HRUBEC, T. C. & S. A. SMITH. 1999. Differences between plasma and serum samples for the evaluation of blood chemistry values in rainbow trout, channel catfish, hybrid tilapias and striped bass. *Journal of Aquatic Animal Health* 11 (2): 116-122.
- HRUBEC, T. C., J. L. CARDINALE & S. A. SMITH. 2000. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured Tilapia (*Oreochromis* hybrid). *Veterinary Clinical Pathology* 29 (1): 7-12.
- JIMÉNEZ-GARCÍA, M. I, V. M. VIDAL-MARTÍNEZ & S. LÓPEZ-JIMÉNEZ. 2001. Monogeneans in introduced and native cichlids in Mexico: Evidence for transfer. *The Journal of Parasitology* 87 (4): 907-909.
- JUNG, S. H., D. S. SIM, M. S. PARK, Q. T. Jo & Y. KIM. 2003. Effects of formalin on haematological and blood chemistry in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquaculture Research* 34 (14): 1269-1275.
- KABATA, Z. 1985. *Parasites and diseases of fish cultured in the tropics*. Taylor & Francis, London, 318 p.
- KAKUTA, I. & K. NAMBA. 1989. Urine properties in carp, *Cyprinus carpio* L., with sekoke disease. *Journal of Fish Diseases* 12 (3): 241-248.
- KAKUTA, I., K. NAMBA, K. UEMATSU & S. MURACHI. 1991. Physiological response of the fish, *Cyprinus carpio*, to formalin exposure. I. Effects of formalin on urine flow, heart rate, respiration. *Comparative Biochemistry and Physiology* 100C (3): 405- 411.
- KAPLAN, A. 1984. Urea. *In: Kaplan, L. A. & A. J. Pesce (Eds.). Clinical chemistry: theory, analysis, and correlation*, 2nd edition. The C.V. Mosby Co., St Louis. 1257-1260 and 437 and 418.

- KARASU BENLI, A. C. & H. YAVUZCAN YILDIZ. 2004. Blood parameters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) spontaneously infected with *Edwardsiella tarda*. *Aquaculture Research* 35 (14): 1388-1390.
- KEBUS, M. J., M. T. COLLINS, M. S. BROWNFIELD, C. H. AMUNDSON, T. B. KAYES & J. A. MALISON. 1992. Effects of rearing density on the stress response and growth of rainbow trout. *Journal of Aquatic Animal Health* 4 (1): 1-6.
- KINGSLEY, G. R. 1939. The determination of serum total protein, albumin and globulin by the Biuret reaction. *The Journal of Biological Chemistry* 131 (1): 197-200.
- KLESIOUS P. H., C. A. SHOEMAKER & J. J. EVANS. 2000. Efficacy of a single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 188 (3-4): 237-246.
- KOLLER, A. & L. A. KAPLAN. 1984. Total serum protein. In: L. A. Kaplan & A. J. Pesce (Eds.). *Clinical chemistry: theory, analysis, and correlation*, 2nd edition. The C.V. Mosby Co., St Louis. 1057-1060.
- LE ROUX, L. E. & A. AVENANT-OLDEWAGE. 2010. Checklist of the fish parasitic genus *Cichlidogyrus* (Monogenea), including its cosmopolitan and host species. *African Journal of Aquatic Science* 35 (1): 21-36.
- MADIGAN, M.T., J. M. MARTINKO & J. PARKER. 2000. Host-Parasite Relationships. In: Madigan, M. T., J. M. Martinko & J. Parker (Eds.). *Brock Biology of Microorganisms* (9th ed.). Prentice Hall. New Jersey. pp. 773-800.
- MARGNI, R. A. 1996. *Inmunología e Inmunoquímica. Fundamentos*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 976 p.
- MARTINS, M. L., J. L. P. MOURIÑO, G. V. AMARAL, F. N. VIEIRA, G. DOTTA, A. M. B. JATOBÁ, F. S. PEDROTTI, G. T. JERÔNIMO, C. C. BUGLIONE-NETO & G. PEREIRA-JR. 2008. Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. *Brazilian Journal of Biology* 68 (3): 657-661.
- MANERA, M. & D. BRITTI. 2006. Assessment of blood chemistry normal ranges in rainbow trout. *Journal of Fish Biology* 69 (5): 1427-1434.
- MAUEL, M. J., D. L. MILLER & A. L. MERRILL. 2007. Hematologic and plasma biochemical values of healthy hybrid tilapia (*Oreochromis aureus* × *Oreochromis niloticus*) maintained in a recirculating system. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 38 (3): 420-424.
- McGEER J. C., L. BARANYI & G. K IWAMA. 1991. Physiological responses to challenge tests in six stocks of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 48 (9): 1761-1771.
- McKEE T. 2003. *Bioquímica. La Base Molecular De La Vida*. 3ª ed. McGraw-Hill/Interamericana, Madrid, 800 p.
- MUÑOZ M. A., M. BALÓN & C. FERNÁNDEZ. 1983. Direct determination of inorganic phosphorus in serum with a single reagent. *Clinical Chemistry* 29 (2): 372-374.
- PACHECO-ÁVILA, J., A. CABRERA-SANSORES & R. PÉREZ-CEBALLOS. 2004. Diagnóstico de la calidad del agua subterránea en los sistemas municipales de abastecimiento en el estado de Yucatán, México. *Ingeniería* 8 (2): 165-179.
- PAPERNA, I. 1991. Diseases caused by parasites in the aquaculture of warm water fish. *Annual Review of Fish Diseases* 1: 155-194
- PAPOUTSOGLU, S. E., H. MILIOU, N. P. KARAKATSOULI, M. TZITZINAKIS & S. CHADIO. 2001. Growth and physiological changes in scaled carp and blue tilapia under behavioral stress in mono- and polyculture rearing using a recirculated water system. *Aquaculture International* 9 (6): 509-518.
- PASNIK, D. J., J. J. EVANS, V. S. PANANGALA, P. H. KLESIOUS, R. A. SHELBY & C. A. SHOEMAKER. 2005. Antigenicity of *Streptococcus agalactiae* extracellular products and vaccine efficacy. *Journal of Fish Diseases* 28 (4): 205-212.
- PRIETO, A. 1987. Monogéneos (Platyhelminthes). Parásitos de peces de interés comercial sometidos a cultivos intensivos en Cuba; sistemática, patología y control. Tesis de Doctorado. Academia de Ciencias de Cuba, La Habana, Cuba. 151 p.
- POPMA, T. & M. MASSER. 1999. *Tilapia Life History and Biology*. Southern Regional Aquaculture Center, USA, Publication No. 283.
- PULIDO, A., C. IREGUI, J. FIGUEROA & P. KLESIOUS. 2004. Estreptococosis en Tilapia (*Oreochromis* spp) cultivadas en Colombia. *AquaTIC* 20: 97-106. Disponible en línea en <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=p&c=170> (consultado el 5 de enero de 2012).
- ROMANO, L. A. & J. MEJÍA. 2003. Infección por *Streptococcus iniae*: Una enfermedad emergente que afecta a peces de cultivo y a humanos. *Revista AquaTIC* 18: 25-32. Disponible en línea en <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=p&c=12> (consultado el 14 de enero de 2012).
- RUBIO-GODOY, M., R. PORTER & R. C. TINSLEY. 2004. Evidence of complement-mediated killing of *Discocotyle sagittata* (Platyhelminthes, Monogenea) oncomiracidia. *Fish and Shellfish Immunology* 17 (2): 95-103.
- SAHU, B. B., A. M. RADHEYSHY, K. KUMAR, S. C. MUKHERJEE & S. AYYAPPAN. 1999. Farmer participatory fish disease surveillance and monitoring: Use of PRA tools. *Tropical Agricultural Research and Extension* 2 (2): 118-123.
- SAKAMOTO K., G. A. LEWBART & T. M. SMITH II. 2001. Blood chemistry values of juvenile red pacu (*Piaractus brachypomus*). *Veterinary Clinical Pathology* 30 (2): 50-52.
- SANDOVAL-GÍO, J. J., R. RODRÍGUEZ-CANUL & V. M. VIDAL-MARTÍNEZ. 2008. Humoral antibody response of the Tilapia *Oreochromis niloticus* against *Cichlidogyrus* spp. (Monogenea). *The Journal of Parasitology* 94 (2): 404-409.
- SHELBY, R. A., J. SHOEMAKER, J. EVANS & P. H. KLESIOUS. 2001. Development of an indirect ELISA to detect humoral response to *Streptococcus iniae* of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Applied Aquaculture* 11 (1-2): 35-44.

- SHELTON, W. L. & T. J. POPMA. 2006. Tilapia biology. In: Lim C. E. & C. D. Webster (Eds.). *Tilapia: Biology, Culture and Nutrition*, Haworth Press, Binghamton, NY, pp. 1-49.
- SHOEMAKER, C. A., P. H. KLESIUS & J. J. EVANS. 2001. Prevalence of *Streptococcus iniae* in tilapia, hybrid striped bass, and channel catfish on commercial fish farms in the United States. *American Journal of Veterinary Research* 62 (2): 174-177.
- SHULL, B. C., H. LEES & P. K. LI. 1980. Mechanism of interference by hemoglobin in the determination of total bilirubin. I. Method of Malloy-Evelyn. *Clinical Chemistry* 26 (1): 22-25.
- SILVEIRA-COFFIGNY, R., A. PRIETO-TRUJILLO & F. ASCENCIO-VALLE. 2004. Effects of different stressors in haematological variables in cultured *Oreochromis aureus* S. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 139 (4): 245-250.
- SLOT, C. 1965. Plasma creatinine determination a new and specific Jaffe reaction method. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 17 (4): 381-387.
- SMITH, S. L. 1991. *Introduction to fish physiology*. Argent Lab., Redmond, WA, 352 p.
- TRINDER, P. 1969. Determination of blood glucose using an oxidase peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *Journal of Clinical Pathology* 22 (2): 158-161.
- VIDAL-MARTÍNEZ, V. M., M. L. AGUIRRE-MACEDO, T. SCHOLZ, D. GONZÁLEZ-SOLÍS & E. F. MENDOZA-FRANCO. 2002. *Atlas de los helmintos parásitos de cíclidos de México*. Instituto Politécnico Nacional, México, 184 p.
- WEINSTEIN, M. R., M. LITT, D. A. KERTESZ, P. WYPER, D. ROSE, M. COULTER, A. MCGEER, R. FACKLAM, C. OSTACH, B. M. WILLEY, A. BORCZYK & D. E. LOW. 1997. Invasive infections due to a fish pathogen, *Streptococcus iniae*. *The New England Journal of Medicine* 337 (9): 589-594.
- WU, A. 2006. *Tietz clinical guide to laboratory tests*, 4th Edition, W.B. Saunders, Philadelphia, PA, USA. 1856 p.
- YAVUZCAN YILDIZ, H., S. PULATSU & F. KURTOGLU. 1997. Baseline haematological and serological parameters of healthy Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Animal Science Papers and Reports* 15 (4): 213-217.
- YAVUZCAN YILDIZ, H. 1998. Effects of experimental infection with *Pseudomonas fluorescens* on different blood parameters in carp (*Cyprinus carpio* L.). *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* 50 (2): 82-85.
- YAVUZCAN YILDIZ, H. 2009. Reference biochemical values for three cultured Sparid fish: striped sea bream, *Lithognathus mormyrus*; common dentex, *Dentex dentex*; and gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Comparative Clinical and Pathology* 18 (1): 23-27.
- ZAKI, M. S., O. M. FAWZI & J. EL-JACKEY. 2008. Pathological and biochemical studies in *Tilapia nilotica* infected with *Saprolegnia parasitica* and treated with potassium permanganate. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science* 3 (5): 677-680.

Recibido: 23 de mayo del 2012.

Aceptado: 11 de abril del 2013.