

01674



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION,  
Y DE LA SALUD ANIMAL

Evaluación del efecto del extracto de ajo  
(*Allium sativum*), sobre *Aeromonas hydrophila* *In*  
*vitro* y en tilapias (*Oreochromis* sp) infectadas  
experimentalmente.

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

**IVONNE GRANADOS ALVAREZ**

TUTOR: MANUEL JIMENEZ ESTRADA

COMITE TUTORAL:

PEDRO OCHOA GALVAN

LUIS OCAMPO CAMBEROS

COLABORADOR INVITADO:

ARMANDO NAVARRO OCAÑA



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIAS

Este trabajo es, entre muchas cosas un fragmento de mi vida, dedicado

**A mis padres**, con su amor me regalaron eso, mi vida.

Los amo.

**A mis hermanos**, sus experiencias me han enseñado a vivir.

Los quiero.

**A mi familia**, por aceptarme en sus vidas y creer en mi.

Con cariño.

**A mi esposo**, porque esto es parte de "nuestro proyecto de vida". TE AMO.

**A mis suegros**, por recibirme en su vida. Con profundo aprecio, gratitud y respeto.

**A mis amigos**, quienes me permiten ser y compartir parte de nuestras vidas.

Los quiero mucho.

**A Kora**, por llenar cada hueco de mi vida. Con gratitud donde quiera que estés. †

# AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Manuel Jiménez Estrada, el haberme brindado confianza, apoyo y su valiosa amistad desde el primer momento.

Reconozco al Dr. Pedro Ochoa Galván quien me ha guiado y apoyado desde años atrás, gracias.

Un profundo agradecimiento al M en C. Armando Navarro Ocaña, quien me ofreció su colaboración, enseñanzas y confianza en todo momento bajo la consigna de superarme.

Al M en C Luis Ocampo Camberos, por las enseñanzas de vida.

Agradezco al Dr. Alejandro Cravioto Jefe del laboratorio de salud pública de la Facultad de Medicina-UNAM, por permitirme realizar parte del proyecto en las instalaciones a su cargo.

Sincero reconocimiento y gratitud al Dr. Carlos Eslava, por sus atinados consejos.

Manifiesto agradecimiento al Dr. Fernando Constantino Casas Jefe del Dpto. de Patología de la FMVZ - UNAM e integrante del comité revisor, por su enseñanza paciente y precisa.

MVZ Esp. Patología Carlos Cedillo Peláez reconozco y agradezco el apoyo altruista en la parte histopatológica de este trabajo.

Al Técnico Luis A. Morales y colaboradores del departamento de Patología de la FMVZ, gracias por su ayuda.

Reconozco al departamento de especies no tradicionales por medio de la MVZ Ana Auró por las facilidades en instalaciones, equipo y personal.

A la Universidad Autónoma Chapingo, a través del Ing. Andrés R. López García, así como a la SAGARPA por medio de la piscifactoría "El Rodeo", por la donación de organismos.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de quienes obtuve apoyo económico durante el proyecto.

De igual manera agradezco al Sistema Nacional de Investigadores y al programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal por los estímulos concedidos.

Reconozco a la Biblioteca "José de la Luz Gómez" de la FMVZ en particular al los Señores Arturo Durazno, Alfredo Guzmán, Francisco Ponce, Atilano y todos los que en ella laboran.

A la Universidad Nacional Autónoma de México a través de sus Facultades e Institutos.

Reconozco y agradezco a todos los académicos, alumnos, administrativos, acuicultores y campesinos por su orientación, apoyo, impulso, respeto y confianza para este trabajo.

## RESUMEN

El número restringido de antibióticos para uso en acuicultura y el riesgo a un desequilibrio ecológico, impulsan a la investigación a nuevas alternativas terapéuticas. El objetivo de este trabajo fue evaluar la propiedad bactericida de extractos de ajo (*Allium sativum*), sobre *Aeromonas hydrophila in vitro* y en tilapias (*Oreochromis sp.*) infectadas. Se realizaron tres etapas, en la primera se estableció la extracción de metabolitos secundarios del ajo vía lixiviación y maceración, seguido de sus constantes físicas y pureza mediante cromatografía en placa fina. Basados en el método de Kirby-Bauer, en la segunda etapa se determinaron la sensibilidad bacteriana a los extractos, la concentración mínima inhibitoria, así como el efecto bactericida dependiente de la concentración y tiempo. En la tercer etapa, se evaluó el efecto de los extractos por inmersión a dosis constante en tilapias infectadas con *A. hydrophila*, apoyados por tasas de mortalidad, aislamiento e identificación por serología e histopatología. De la primera etapa, se obtuvieron los extractos acuoso fresco (EAF), acuoso liofilizado (EAL) y macerado (EM) que revelaron metabolitos precursores de la alicina. En las pruebas *in vitro*, se evaluaron los EAF, EAL, EM y un extracto estabilizado (EE) llamado Biodegerm<sup>®</sup>. Los EAL y EM no tienen efecto bactericida en *A. hydrophila* ( $p < 0.05$ ), comparados con el efecto de las Oxitetraciclina (OTC), contrario al EAF y EE que si lo expresaron ( $p > 0.05$ ). Por otra parte, la exposición de *A. hydrophila* durante 30 - 60 min. con el EAF fue suficiente para matar un 99.9% de bacterias. En la última etapa del trabajo, se encontraron tasas de mortalidad del 96% en organismos tratados con Biodegerm<sup>®</sup> en contraste con el 7.8% de organismos tratados con OTC y con el 34% de organismos expuestos al EAF ( $p > 0.05$ ). De las cepas reaisladas de los tratamientos y controles negativos, el 100% mostraron evidencia de no ser entéricas y el 3.3% correspondieron a *A. hydrophila*. Por otra parte, se estableció a nivel tisular, los mecanismos de defensa primarios, inflamación y reparación generados como respuestas a la laceración. Por tanto, el EAF de ajo muestra evidencia de actividad bactericida contra cepas de *Aeromonas* y se puede proponer como un agente terapéutico alternativo contra infecciones asociadas con *Aeromonas* en la acuicultura.

Palabras clave: Extracto, acuoso, ajo, *Allium sativum*, *Aeromonas hydrophila*, bactericida, tilapia, *Oreochromis sp.*

## ABSTRACT

The restricted number of antibiotics at use in aquaculture and the ecological unbalance risk prompt to the search for new therapeutic alternatives. The aim of this work is to assess the bactericidal property of garlic extracts (*Allium sativum*), specifically on *Aeromonas hydrophila in vitro* and on infected tilapias (*Oreochromis* sp.). Three stages were established. In the first one, the extraction of the secondary metabolites by means of lixiviation and maceration, followed by the obtaining of their physical constants and purity by thin layer chromatography was carried out. Based on the Kirby-Bauer method, in the second stage the bacterial sensibility towards the extract was determined, the minimum inhibitory concentration as well as the time and concentration dependence of the bactericidal effect. In the third stage, the effect of the extracts by immersion at a fixed concentration was assessed on tilapias infected with *A. hydrophila*, supported by the mortality rates, isolation and serological identification of the bacteria and histopathology. From the first stage, the fresh aqueous extract (FAE), the freeze-dried extract (FDE) and macerated extract (ME) were obtained, which revealed allicin-precursor compounds. In the *in vitro* tests, was assessed the FAE, FDE, ME and a stabilized extract (EE) named Biodegerm<sup>®</sup>. The FDE and ME showed to have no bactericidal effect on *A. hydrophila* ( $p < 0.05$ ), when compared with the Oxitetracycline (OTC) effect, opposite to that of the FAE and EE that did show it ( $p > 0.05$ ). In the other hand, the 30-60 min. exposure to *A. hydrophila* to the FAE was enough to kill 99.9% of the bacteria. In the last stage, mortality rates of 96% in Biodegerm<sup>®</sup>-treated organisms were found, more than the 7.8% of the OTC-treated organisms and the FAE-treated ( $p > 0.05$ ). 100% of the re-isolated strains of the treatments and controls showed to be non-enteric and 3.3% corresponded to *A. hydrophila*. In the other hand, at the tissue level was established, the primary defense mechanisms, inflammation and reparation were observed, there are responses induced by laceration. Therefore, the garlic FAE shows bactericidal activity evidence against *Aeromonas* strains and it can be postulated as an alternative therapeutic agent against infections associated with *Aeromonas* in aquaculture.

Keywords: Aqueous, garlic, extract, *Allium sativum*, *Aeromonas hydrophila*, bactericidal, tilapia, *Oreochromis* sp.

# CONTENIDO

1.	<b>RESUMEN</b>	
2.	<b>INTRODUCCIÓN</b>	
2.1.	Antecedentes	1
2.1.1.	Cultivo de tilapia	1
2.1.2.	Sanidad acuícola	2
2.1.3.	<i>Aeromonas hydrophila</i>	2
2.1.4.	Septicemia hemorrágica	4
2.1.5.	Terapéutica	5
2.1.6.	El ajo en la medicina tradicional	5
2.1.7.	Generalidades del ajo	6
2.1.8.	Farmacognosia del ajo	6
2.1.9.	Farmacoterapia del ajo	8
2.2.	Justificación	8
2.3.	Hipótesis	9
2.4.	Objetivo general	9
2.5.	Objetivos específicos	9
3.	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
3.1.	Fase Uno	10
3.1.1.	Material vegetal	10
3.1.2.	Obtención de extractos	10
3.1.3.	Cromatografía en placa delgada	11
3.2.	Fase Dos	11
3.2.1.	Material microbiológico	11
3.2.2.	Sensibilidad de cepas de especies de <i>Aeromonas</i> y de referencia	12
3.2.3.	Concentraciones mínima inhibitoria y bactericida de los extractos	12
3.2.4.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria	13
3.2.5.	Determinación de la concentración mínima bactericida	13
3.3.	Fase Tres	14
3.3.1.	Instalaciones	14
3.3.2.	Material biológico	14
3.3.3.	Prueba de desafío	15
3.3.4.	Terapéutica	15
3.3.5.	Incidencia de infección	16
3.3.5.1.	Re- aislamiento bacteriano	16
3.3.5.2.	Prueba de citocromo C oxidasa	17
3.3.5.3.	Serología	17
3.3.5.4.	Histopatología	19

3.4.	Análisis Estadístico	20
3.4.1.	Concentración mínima inhibitoria	20
3.4.2.	Concentración mínima bactericida	21
3.4.3.	Características fisicoquímicas del agua	21
3.4.4.	Mortalidad	22
4.	<b>RESULTADOS</b>	
4.1.	Fase Uno	23
4.1.1.	Pruebas químico analíticas en extractos	23
4.2.	Fase Dos	24
4.2.1.	Sensibilidad de cepas de <i>Aeromonas</i> sp.	24
4.2.2.	Concentración mínima inhibitoria de los extractos	24
4.2.3.	Concentración mínima bactericida	25
4.3.	Fase Tres	26
4.3.1.	Calidad del agua	26
4.3.2.	Mortalidad	26
4.3.3.	Incidencia de infección	27
5.	<b>DISCUSIÓN</b>	
5.1.	Mecanismo de extracción	30
5.2.	Efecto de los extractos <i>in vitro</i>	31
5.3.	Efecto de los extractos <i>in vivo</i>	34
6.	<b>CONCLUSIONES</b>	
6.1.	Conclusiones	
6.2.	Perspectivas	
7.	<b>REFERENCIAS</b>	39
8.	<b>CUADROS</b>	46
9.	<b>FIGURAS</b>	60
10.	<b>ANEXO</b>	73

# LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>Cuadro 1.</b>	Sensibilidad bacteriana a los distintos extractos (sin diluir) y OTC en cepas de referencia y <i>A. hydrophila</i> , medida en mm de zonas inhibitorias.	46
<b>Cuadro 2.</b>	Concentración mínima inhibitoria (mm) del extracto acuoso fresco de ajo a diferentes diluciones en cepas de <i>Aeromonas</i> .	47
<b>Cuadro 3.</b>	Efecto bactericida del extracto acuoso fresco de ajo en 48 cepas de <i>Aeromonas</i> , expresados por dilución en proporciones de cepas sensibles a moderadamente sensibles y resistentes.	48
<b>Cuadro 4.</b>	Comparación de la actividad bactericida entre extractos y OTC a concentración constante, en cepas de <i>Aeromonas</i> y de referencia; medido en mm promedio de zonas de inhibición.	49
<b>Cuadro 5.</b>	Rangos establecidos de sensibilidad de cepas de referencia ante una concentración constante de tetraciclinas, expresados en mm de zonas de inhibición.	50
<b>Cuadro 6.</b>	Comparación por tiempos de la velocidad del efecto bactericida del extracto acuoso fresco de ajo sobre tres cepas de <i>Aeromonas</i> y la solución control, medido en UFC /mL.	51
<b>Cuadro 7.</b>	Comparación entre tratamientos de los parámetros de calidad del agua obtenidos durante los bioensayos.	52
<b>Cuadro 8.</b>	Comparación entre bioensayos de parámetros de calidad del agua tomados durante el experimento.	53
<b>Cuadro 9.</b>	Mortalidad de peces en los diferentes tratamientos durante los bioensayos.	54
<b>Cuadro 10.</b>	Ajuste de proporciones a porcentajes de mortandad en peces.	55

<b>Cuadro 11.</b>	Comparación de tasas de mortalidad entre tratamientos, expresado en porcentajes.	56
<b>Cuadro 12.</b>	Incidencia de infección a través de la proporción de bacterias reisladas de la zona lacerada de peces.	57
<b>Cuadro 13.</b>	Proporciones de hallazgos histopatológicos en epitelio de peces observados de los diferentes tratamientos durante la ultima fase del experimento.	58
<b>Cuadro 14.</b>	Proporciones de hallazgos histopatológicos en tejido muscular de peces observados de los diferentes tratamientos durante la ultima fase del experimento.	59

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b>	Patogenia de la septicemia hemorrágica en peces de agua continental.	4
<b>Figura 2</b>	Mecanismo de formación de alicina, tomado de Reuter y Sendl.	7
<b>Figura 3</b>	Mecanismo de formación de los ajoenos, tomado de Reuter y Sendl.	7
<b>Figura 4</b>	Cromatograma de referencia de los compuestos presentes en extractos de Ajo.	60
<b>Figura 5</b>	Cromatograma en placa fina, compuestos revelados con ninhidrina.	60
<b>Figura 6</b>	Cromatograma en placa fina, compuestos revelados con sulfato cérico.	60
<b>Figura 7</b>	Cromatograma en placa fina, compuestos revelados con ninhidrina de los extractos usados en la fase dos.	61
<b>Figura 8</b>	Cromatograma de los extractos acuosos de ajo usados en la fase tres del experimento.	61
<b>Figura 9</b>	Sensibilidad de cepas de <i>Aeromonas</i> a los extractos bajo las categorías de sensibilidad a moderada sensibilidad y resistente.	62
<b>Figura 10</b>	Correlación entre el efecto bactericida del EAF y el tiempo necesario para inhibir el crecimiento de <i>Aeromonas hydrophila</i> .	63
<b>Figura 11</b>	Comparación entre el efecto bactericida del EAF y el tiempo necesario para inhibir el crecimiento de cepas de <i>Aeromonas</i> .	64
<b>Figura 12</b>	Promedios Totales de los Parámetros de Agua observados en los seis tratamientos, durante el experimento.	65
<b>Figura 13</b>	Sección histológica de capa muscular de organismo infectado y tratado con EAF (H & E, 100 x).	66

<b>Figura 14</b>	Histológica de piel, organismo infectado y tratado con EAF (H & E, 400 x).	66
<b>Figura 15</b>	Aspecto general de lesiones en organismo infectado y tratado con EE (H & E, 40 x).	67
<b>Figura 16</b>	Detalle de hallazgos en organismo infectado y tratado con EE (H & E, 60 x).	67
<b>Figura 17</b>	Aspecto panorámico de estrato muscular; organismo infectado y tratado con OTC (H & E, 40 x).	68
<b>Figura 18</b>	Epidermis de organismo infectado y tratado con OTC (H & E, 40 x).	68
<b>Figura 19</b>	Vista panorámica de lesión en piel y músculo, organismo infectado sin tratamiento (H & E, 40 x).	69
<b>Figura 20</b>	Tejido muscular; organismo infectado sin tratamiento (H & E, 60 x).	69
<b>Figura 21</b>	Acercamiento de tejido muscular de organismo infectado sin tratamiento (H & E, 400 x).	69
<b>Figura 22</b>	Sección histológica de tejidos epitelial y muscular; organismo control de manejo (H & E, 60 x).	70
<b>Figura 23</b>	Acercamiento de tejido muscular; organismo control de manejo (H & E, 400 x).	70
<b>Figura 24</b>	Sección de piel; organismo expuesto únicamente al extracto acuoso de ajo (H & E, 60 x).	71
<b>Figura 25</b>	Vista panorámica de epidermis, dermis y muscular, organismo expuesto al EAF (H & E, 40 x).	71
<b>Figura 26</b>	Sección histológica; organismo expuesto al extracto acuoso fresco de ajo sin infección (H & E, 40 x).	72
<b>Figura 27</b>	Detalle de melanomacrófagos fuertemente cargados de melanina (H & E, 400 x).	72

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Antecedentes

A inicios de este milenio la tendencia de consumo de carnes rojas en todo el mundo ha disminuido, incrementada así la demanda de fuentes distintas de proteína animal; la creación de nuevos sistemas de comercio global entre países capitalistas; la opinión pública que reconoce la deficiencia de nuevos recursos pesqueros, la sobre-explotación de mares y la necesidad de cuidarlos; son factores que ponen a la acuicultura como una buena alternativa de producción animal.

#### 2.1.1. Cultivo de tilapia

Dentro de la acuicultura actual la tilapia se perfila como uno de los principales productos acuícola en expansión con un sistema de producción tecnificado y en serie, capaz de mantener un crecimiento del 20 – 30% anual constante en los mercados propios y exteriores. <sup>1</sup>

Los peces conocidos como "mojarras" o "tilapias" (*Oreochromis* sp.) pertenecen a un grupo numeroso de cíclidos de origen africano introducidos a México (1964), se encuentra entre las especies más importantes en la acuicultura global y nacional, ya que muestra buena tolerancia a vivir en espacios reducidos y con amplia variedad de alimento; crecimiento eficiente y facilidad para reproducirse. <sup>2,3</sup>

Hasta hace algunos años, la técnica de producción predominante para las tilapias, era de manera extensiva o de repoblación, no obstante, en la actualidad se observa la tendencia hacia la intensificación de unidades productivas, llevadas acabo en cualquier región y estanques, en mono o poli-cultivos. Sistemas productivos con resultados impresionantes de tonelaje por cuerpos de agua pequeños y tiempos cortos, disminución de mano de obra, inversión reducida para algunos insumos, extensiones de tierra menores, entre otros beneficios. Sin embargo, las altas densidades de organismos (factor común en todos ellos) favorecen la presencia de epizootias de manera frecuente, lo que se traduce a mermas en la producción, precios bajos en el mercado y poca calidad sanitaria.

### **2.1.2. Sanidad acuícola**

La mayoría de los problemas que afectan las especies acuáticas están asociados a diferentes condiciones ambientales, de manejo, nutrición, genética, calidad del agua y a la presencia de enfermedades. Estímulo para identificar y prevenir la problemática desde un punto de vista sanitario y/o socioeconómico, evitando repercusiones en el comercio nacional e internacional.

La emisión de Normas Oficiales Mexicanas preventivas a la introducción y dispersión de enfermedades durante la importación de organismos acuáticos vivos destinados para acuicultura y ornato, establecieron a las enfermedades de tipo notificable, entre las que se encuentra la aeromoniasis; enfermedad importante en términos productivos, con impacto negativo sobre poblaciones silvestres de peces y la amenaza en salud pública que esto representa.<sup>4,5</sup>

### **2.1.3. *Aeromonas hydrophila***

En la actualidad *Aeromonas hydrophila*, es un microorganismo acuático ubicuo, ampliamente diseminado en hábitat natural como plantas acuáticas, suelos, aguas residuales, ríos, lagos y mar. También se han aislado de agua potable, piscinas y reservorios, después del proceso de cloración. En el campo acuícola, se ha aislado de mucosas y órganos internos de peces de agua dulce o marinos, clínicamente sanos.<sup>6</sup>

Clasificada según el "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", modificado y editado por Holt y Krieg<sup>7</sup>, la *A. hydrophila* se encuentra en la sección de los bacilos gram negativos anaerobios facultativos, familia II *Vibrionaceae* y género III *Aeromonas*; miden 1.0x3.5  $\mu\text{m}$ , móviles por un flagelo polar, heterótrofos, oxidasa y catalasa positivos, reducen nitrato a nitrito, fermentadores de la D-glucosa como fuente principal de carbono y energía, microorganismo de perfil mesofílico;<sup>6</sup> generalmente se desarrolla en sitios húmedos, a un rango de temperatura que oscila de los 0° C a los 41° C para su crecimiento y abundante sustrato.<sup>7</sup>

En peces de agua dulce, la *A. hydrophila* se considera oportunista y está asociada con varios miembros del género *Aeromonas* (*A. sobria*, *A. caviae*, *A. veronii*, *A. liquefaciens*, *A. punctata* y *A. schuberti*), ubicados también en ambientes acuáticos, sin

embargo, se menciona a la *A. hydrophila* como uno de los patógenos más importante en peces dada una serie de factores de virulencia como,

I. Proteínas de la membrana externa:

- a. Capa - S, pared celular acomodada en sub-unidades tetragonales, asociada al auto agregación, hidrofobicidad y hemoaglutinación: mantiene la integridad estructural y morfología de las bacterias, es responsable de la interacción entre la bacteria y el medio, así mismo la protege físicamente de la acción lítica de las proteínas séricas y de los bacteriófagos.<sup>8,9,10</sup>
- b. Antígeno - O, lipopolisacarido también llamado endotoxina; confiere estabilidad celular y anclaje a la membrana externa para la viabilidad bacteriana.<sup>11</sup>
- c. Antígeno - H, flagelo constituido de sub-unidades polimerizadas de flagelina anclados a la doble bicapa lipídica. Incluidos los tipos polares y lateral ambos en forma de hélice con punta de gancho, exportadores de toxinas, responsables de la motilidad y la formación de la bio película que protege a los patógenos del medio y les permite adherirse al tejido del huésped para colonizar e invadirlo.<sup>12</sup>

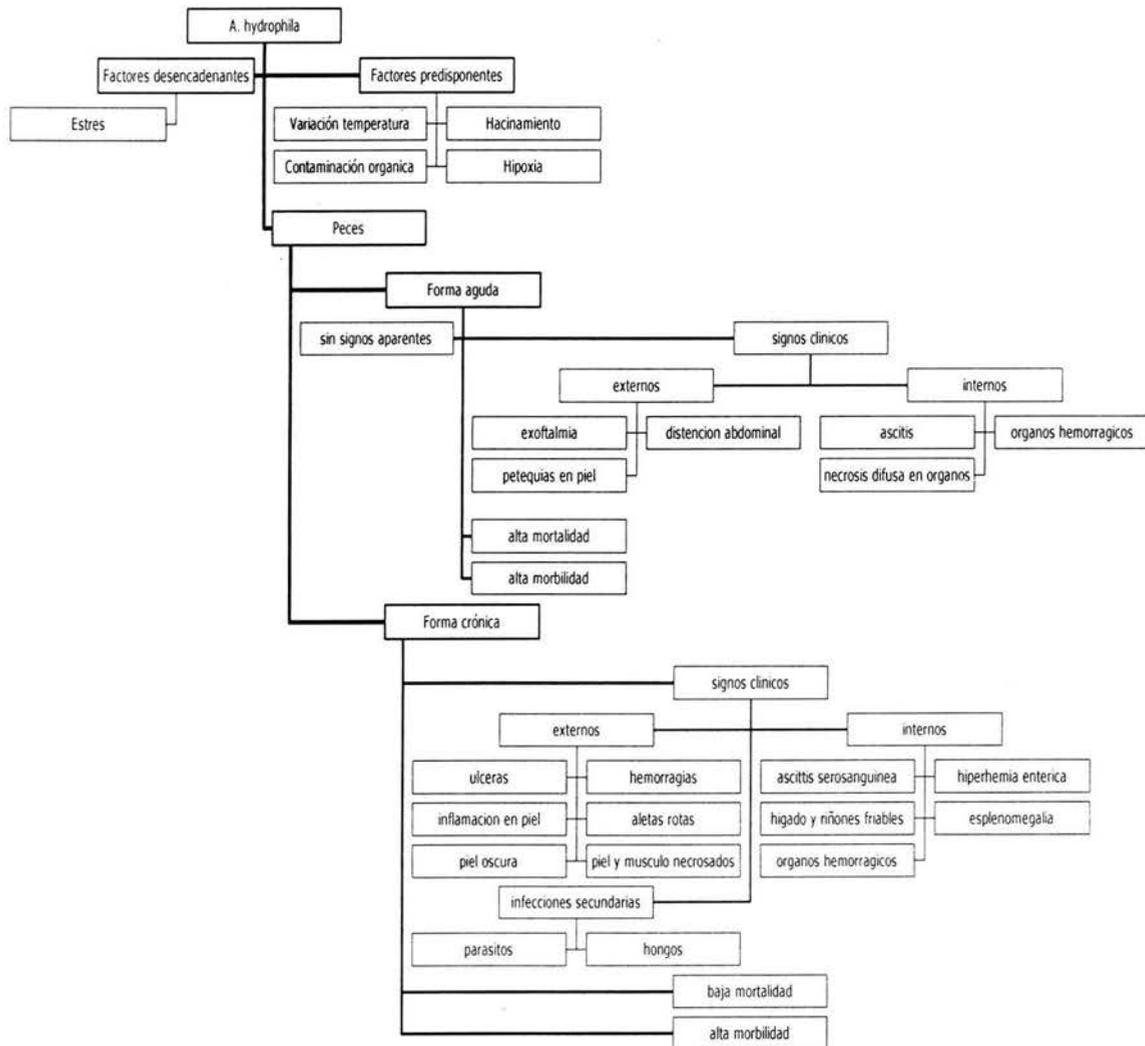
II. Proteínas extracelulares (exotoxinas y exoenzimas):

- a. Hemolisinas, la *A. hydrophila* secreta dos tipos de hemolisinas, la aerolisina, formadora de canales en la membrana celular eritrocítica del huésped provocando muerte celular; el otro tipo es la hemolisina no formadora de canales, ambas beta-hemolíticas y activan proteasas (incluida la tripsina)<sup>9</sup>
- b. Proteasas, oligopéptidos como la peptidasa-sérica (termolábil) y la metalopeptidasa (termoestable), proporcionan protección contra los efectos bactericidas séricos del huésped, colabora en la nutrición bacteriana liberando amino ácidos y en la proliferación por destrucción tisular e invasividad. También, las proteasas participan en la retroalimentación positiva de maduración de exotoxinas como la aerolisina.<sup>6,9,10</sup>
- c. Enterotoxina, toxina citotónica, induce la acción del AMPc de las células huésped e hipersecreción de fluidos; contribuye a la invasividad y replica bacteriana.<sup>13</sup>

La *A. hydrophila* tiene la capacidad de infectar vertebrados, incluidos anfibios, reptiles acuáticos y al hombre.<sup>6,8,13</sup>

### 2.1.4. Septicemia hemorrágica

También llamada aeromoniasis, septicemia de *Aeromonas* móvil, infección por *Aeromonas* móvil, síndrome epizootico ulcerativo, hidropesía infecciosa, hidropesía abdominal infecciosa, aletas rotas, piel rota y ulcera roja. Es uno de los mayores problemas en acuicultura de agua continental en muchas áreas del mundo debido a su presentación aguda o crónica con alta prevalencia e impacto económico negativo.<sup>14,15,16</sup> La Septicemia hemorrágica es causada por *A. hydrophila* y desencadenada principalmente en peces sometidos a estrés.<sup>17</sup> El curso de la enfermedad se describe en la figura 1.



Diseñado por Granados AI, 2004.

**Figura 1.** Patogenia de la septicemia hemorrágica en peces de agua continental.

### **2.1.5. Terapéutica**

El tratamiento contra enfermedades de origen bacteriano, puede estar basado en una revisión y modificación de la calidad del agua, manejo y alimentación o con el uso de antibióticos; de esto último es importante mencionar que existe una amplia gama de antibióticos que se han utilizado contra bacterias del género *Aeromonas* sp.; dentro de los cuales encontramos miembros de grupos de aminopenicilina, aminoglucosidos, cefalosporinas 1a, 2a, 3a y 4a generación, sulfas-trimetoprim, quinolonas, carbapenems, monobactams, nitrofuranos y Tetraciclinas;<sup>18</sup> suministrados peces por: a) vía oral, esto es mezclado en el alimento; b) inyección 1.- intra peritoneal, 2.-intra vascular, 3.- intra muscular, ó c) baños de inmersión. No obstante, pocos han sido aprobados por la Agencia de Alimentos y Medicamentos (FDA)<sup>19,20,21,22</sup>.

La dificultad para calcular y/o suministrar las dosis adecuadas por cada organismo, así como el abuso o mal uso de estos productos inducen por una parte a gastos económicamente injustificables, por otro lado, problemas de resistencia etiológica, o lo contrario, índice residual elevado y a escala ambiental problemas ecológicos; por ello, se apunta hacia la medicina tradicional como alternativa terapéutica.<sup>23,24</sup>

### **2.1.6. El ajo en la medicina tradicional**

El uso de plantas medicinales ha prevalecido durante años y la medicina herbolaria ha sido la base de terapias muy útiles, por lo que, el estudio científico de los productos naturales con propiedades medicinales radicó en los remedios tradicionales empleados por diversas culturas; así se descubrieron compuestos de importancia farmacéutica para la medicina convencional (alópata) como la atropina, vincristina, digitoxina, reserpina y esteroides naturales, por mencionar algunos.<sup>25,26</sup>

El ajo sin duda es el remedio preferido, pues su eficacia preventiva y curativa ha sido comprobada desde hace más de 5000 años, documentado en el "códice Ebers" un papiro medicinal egipcio que data de 1550 A. C. Este último, contiene más de 800 formulas terapéuticas y 22 de ellas señalan al ajo como un efectivo remedio para una variedad de padecimientos. A la vez que pensadores griegos como Aristóteles, Hipócrates y Aristofanes le recomendaron durante los juegos olímpicos, como un estimulante para mejorar el rendimiento atlético.<sup>27,28</sup>

### 2.1.7. Generalidades del ajo

Físicamente, la planta hortícola originaria de Asia central, está constituida por hojas que miden alrededor de 30-80 cm de alto, con grosor de 6-12 mm y que emergen desde la parte baja del tallo que es hueco, sin divisiones y circundado por las hojas. En la parte más alta del tallo, se encuentra una esfera constituida por un número de flores pequeñas de colorido verdoso con blanco y matizadas de rojo. La parte intermedia de la planta corresponde al bulbo, porción con particular interés en el presente trabajo dada su importancia terapéutica. El bulbo está dividido en "dientes" que forman un botón con tonalidades en blanco a amarillo claro o beige, cubierto con finas capas de cascarilla y en la base de éste, se encuentran sus raíces.<sup>27,28,29</sup>

#### Clasificación taxonómica

Género <i>Allium</i> ,	Orden <i>Asparagales</i> ,	Clase <i>Monocotiledóneas</i> ,
Especie <i>sativum</i> ,	Superorden <i>Lilianeae</i> ,	Subclase <i>Liliidae</i>
Familia <i>Alliaceae</i> ,		

### 2.1.8. Farmacognosia del ajo

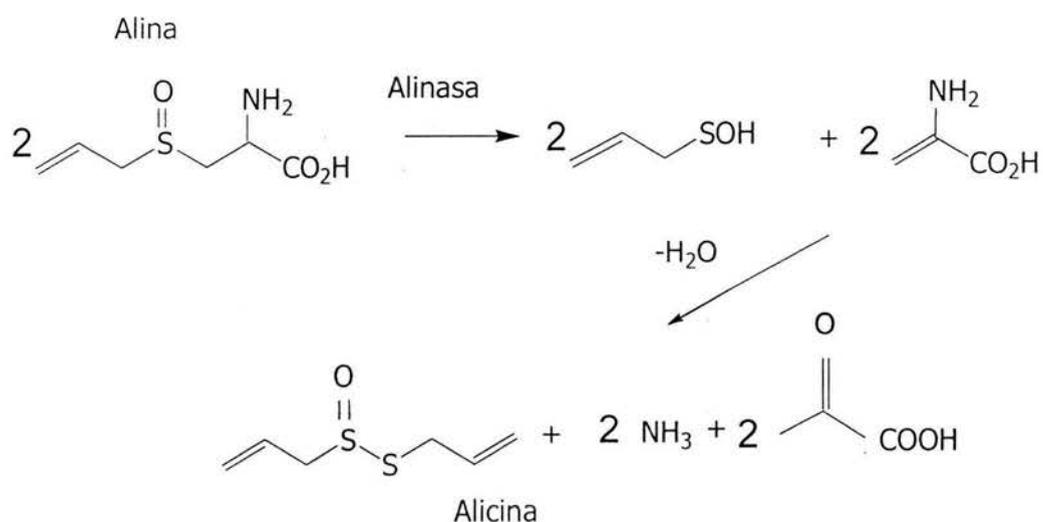
Constituido químicamente de agua, compuestos azufrados, carbohidratos, proteínas, amino ácidos, lípidos, vitaminas y minerales. Al respecto, uno de los primeros estudios químicos serios de la composición del ajo lo realizó el químico alemán Theodor Wertheim en 1844, quien extrajo olorosas sustancias volátiles, a los que propuso el nombre de allil (relativo a *Allium*).<sup>27,28</sup>

Trabajo retomado por el químico alemán Semmler en 1892, quien de los compuestos extraídos por Wertheim identificó al dialil disulfuro, trisulfuro, tetrasulfuro y dipropyl disulfuro, entre otros.<sup>27,28</sup>

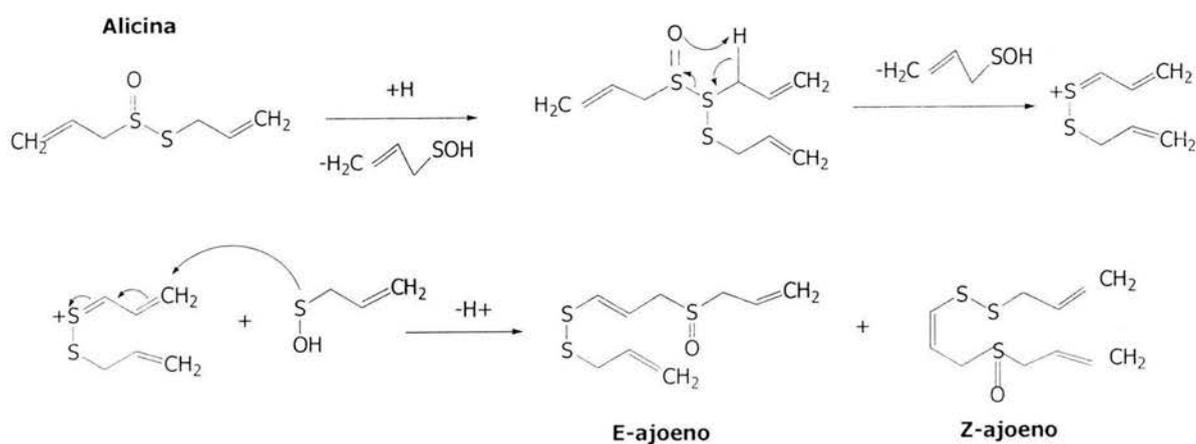
A partir de estos resultados, el siguiente descubrimiento fue hecho por Chester J. Cavallito y su grupo de colaboradores, quienes marcaron como sustancia principal al dialil disulfuro porque a partir de esta sustancia y modificada la técnica de extracción de Semmler, descubrieron al dialil tiosulfinato llamada también alicina.<sup>30,31,32</sup>

Sin embargo, el mecanismo exacto de esta transformación, fue descrito años posteriores por los investigadores Arthur Stoll y Ewald Seebeck (1948) quienes describen que las

células intactas del ajo contienen un derivado de aminoácidos azufrados, el sulfóxido de S-alil(L)-(+)-cisteína o alina, que al romperse las células entra en contacto con la enzima alinasa y es convertido por hidrólisis a alicina (figura 2), producto responsable del olor y sabor característicos del ajo,<sup>33</sup> que al auto condensarse se producen los E y Z ajoenos (figura 3), metabolitos en menor proporción que la alicina, también con actividad antimicrobiana.<sup>29,34,35</sup>



**Figura 2.** Mecanismo de formación de alicina, tomado de Reuter y Sendl.<sup>28</sup>



**Figura 3.** Mecanismo de formación de los ajoenos, tomado de Reuter y Sendl.<sup>28</sup>

### 2.1.9. Farmacoterapia del ajo

Numerosas investigaciones médicas enfocadas a la salud humana, han publicado de los compuestos del ajo, efectos cardiovasculares, <sup>28,36</sup> hipoglicemiantes, <sup>28</sup> antioxidantes, <sup>37</sup> estimulantes inmunes y <sup>38,39</sup> anti-cancerígenos, <sup>40,41</sup> así como, efectos contra enfermedades infecciosas causadas por hongos, <sup>42,43,44</sup> levaduras, <sup>45</sup> parásitos, <sup>46,47,48</sup> virus <sup>49</sup> y bacterias. <sup>50,51,52</sup>

Las propiedades antibióticas del ajo fueron referidas de manera preliminar por Luis Pasteur (1858) quien mostró que el ajo y las cebollas podían matar a los gérmenes causantes de las enfermedades infecto contagiosas; sin embargo, hasta 1944 tras de varios estudios químico farmacológicos, Cavallito *et al.* (1944) señalaron a la allicina como el compuesto activo contra bacterias. Resultados importantes, ya que de estos, se derivaron investigaciones posteriores. <sup>28,29,41</sup>

Dentro de la terapéutica veterinaria el ajo se ha probado como parasiticida, <sup>53</sup> así como, antimicótico. <sup>54</sup>

## 2.2. Justificación

En México agricultores y ganaderos, han cambiado esas actividades por alternativas productivas que puedan realizarse en el campo. Ante esta situación la actividad acuícola se desarrolla rápido y con ello las enfermedades.

La aremoniasis o septicemia hemorrágica es uno de los mayores problemas en acuicultura de agua dulce debido a la alta prevalencia e impacto económico negativo que eso genera. Además, diversos estudios describen a la *Aeromonas hydrophila* como uno de los agentes causales de gastroenteritis en el humano convirtiéndose en un problema de salud pública.

Los antibióticos han sido parte importante para el control y manejo de infecciones bacterianas, empero el abuso o uso empírico de estos productos ha originado microorganismos patógenos resistentes a ellos, índice residual elevado e impacto sobre poblaciones endémicas silvestres y con ello desequilibrios ecológicos.

En virtud que el uso de antibióticos ha sido restringido por las Normas Oficiales Mexicanas y la FDA, es necesario aumentar las alternativas que proporcionen terapéuticas efectivas, biodegradables y viables para la acuicultura.

### **2.3. Hipótesis**

Los componentes del ajo (*Allium sativum*) podrían presentar actividad bactericida contra *Aeromonas hydrophila in vitro* y en tilapias (*Oreochromis sp.*) infectadas con *A. hydrophila*.

### **2.4. Objetivo general**

Evaluar el efecto bactericida de extractos de ajo (*A. sativum*) contra *A. hydrophila in vitro* y en tilapias (*Oreochromis sp.*) infectadas con *A. hydrophila*.

### **2.5. Objetivos específicos**

Durante la primera Fase del experimento:

- 2.5.1. Determinar el mecanismo de extracción de los compuestos de ajo con actividad antibacteriana.
- 2.5.2. Revisar contenido químico de cada extracto obtenido.

Durante la segunda Fase del experimento:

- 2.5.3. Determinar la concentración mínima inhibitoria de los extractos contra *Aeromonas hydrophila*.
- 2.5.4. Determinar la concentración mínima bactericida de los extractos contra *Aeromonas hydrophila*.

Durante la tercera Fase del experimento:

- 2.5.5. En un medio controlado, evaluar el efecto de los extractos de ajo en peces infectados experimentalmente.
- 2.5.6. Observar características fisicoquímicas del agua.
- 2.5.7. Determinar la mortalidad en organismos tratados.
- 2.5.8. Determinar la incidencia infecciosa posterior al tratamiento.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1. Fase Uno

En ésta fase, se trabajó en la obtención y estabilización de extractos de ajo dentro del laboratorio 2-10 del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

#### 3.1.1. Material vegetal

La colección del material se realizó en un mercado de auto servicio. Los criterios de selección del producto fueron: madurez, uniformidad en forma y color, así como homogeneidad en tamaño y peso.

#### 3.1.2. Obtención de los extractos

Los extractos macerado, acuoso fresco y acuoso liofilizado se obtuvieron mediante una modificación a las técnicas de maceración y lixiviación, ésta última descrita por Singh y Shukla,<sup>55</sup> Ahsan e Islam<sup>56</sup> y Cellini<sup>57</sup>; además se evaluó un extracto estabilizado llamado Biodegerm<sup>®</sup>.

#### PROCEDIMIENTOS:

Maceración. Bajo condiciones de esterilidad, se realizó la limpieza de los "dientes", seleccionados por color y textura uniformes. Pesados 100 g, se cortaron en trozos pequeños (5 - 7 mm<sup>2</sup>), se dejaron en contacto con la mezcla de etanol y agua (3:7) en un envase color ámbar de 1L, cerrado y mantenido a temperatura ambiente durante 30 días. Al líquido obtenido se le llamó extracto macerado (EM)

Percolación. Bajo condiciones de esterilidad, se limpiaron y seleccionaron 100 g de "dientes" de ajo para molerlos con aspas y enseguida con mortero. A la pasta obtenida se le agregaron 25 mL de agua destilada estéril y se agitaron a 350 rpm por 1 hora, posteriormente se mantuvo por 2 horas en refrigeración a 4º C. Una vez consistente, se filtró con gasas estériles para centrifugarlo a 7000 rpm durante 45 minutos, se obtuvo el sobrenadante, se filtró a punto de esterilidad por papel Whatman números 1, 2 y 3, así mismo, en membrana millipore de 0.45 µm.

De los extractos obtenidos, se dividieron en dos porciones iguales, una parte se liofilizó a  $-40^{\circ}\text{C}$ , con una presión de 0.0001 mm de mercurio, obteniendo así el extracto liofilizado (EAL) y la otra parte llamada extracto acuoso fresco (EAF), se utilizó de inmediato en los ensayos *in vitro*. Los extractos, se almacenaron en viales estériles y sellados herméticamente (anexo A.1).

El extracto estabilizado (EE (Biodegerm<sup>®</sup>)) es un desinfectante natural a partir de extractos vegetales tales como de extracto cítrico de liliácea (filiferina), ácido cítrico al 5% en solución etanólica y vehículo. El proceso de extracción es mecánico, purificado a través de filtraciones seriadas. Soluble en agua, estable en amplios rangos de pH y la luz.<sup>†</sup>

### **3.1.3. Cromatografía en placa fina (CPF)**

Se desarrollaron placas con los extractos obtenidos (EAF, EM y EAL) y el extracto estabilizado (EE (Biodegerm<sup>®</sup>)), bajo la técnica descrita por Wagner.<sup>58</sup>

#### **PROCEDIMIENTO:**

Las placas de CPF fueron desarrolladas en 1 – butanol: 2 – propano I: ácido acético: agua, en proporciones 3:1:1:1 (volumen / volumen) Secadas a temperatura ambiente, observadas bajo luz UV (366 nm) y reveladas con ninhidrina.

Se marcaron con lápiz las manchas aparecidas con colores característicos de los compuestos activos presentes.

## **3.2. Fase Dos**

Se realizó en el laboratorio de Salud Pública de la unidad de investigación de la Facultad de Medicina – UNAM; corresponde a las pruebas de la actividad bactericida *in vitro* de los extractos obtenidos con anterioridad.

### **3.2.1. Material microbiológico**

Las cepas bacterianas (anexo B.1) provenientes de aislamientos de humanos, de ambientes acuáticos y de alimentos, fueron proporcionadas por el cepario del laboratorio de salud pública Facultad de Medicina de la UNAM.

---

<sup>†</sup> Comunicación personal, MC Ocampo Camberos Luis 30 Marzo 2004.

### 3.2.2. Sensibilidad de cepas de especies de *Aeromonas* y de referencia

Se usaron cepas de *Aeromonas hydrophila* (ATCC (ATCC 49140)), *A. hydrophila* (REF 087202) y de referencia descritas por el Comité Nacional de Estándares Clínicos de Laboratorio (NCCLS)<sup>59</sup> *Streptococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *E. coli* (K12 14RS19) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); la susceptibilidad *in vitro* se determinó por el método de difusión de disco.<sup>60,61</sup>

#### PROCEDIMIENTO:

Se prepararon cinco grupos de seis discos cada uno, para el grupo 1 con 20 µl (80 µg) de EAF, para el grupo 2 EAL re hidratado (20 µL con 80 µg), el grupo 3 con EE (20 µL), el cuarto grupo con 20 µl solución "madre"<sup>59</sup> (anexo B.2) de OTC base y por último el quinto grupo con EM (20 µl), dejándolos secar en una campana de flujo laminar por 5 minutos.

Por otra parte, los inóculos fueron preparados con cultivos frescos ajustados al valor 0.5 de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC / mL). El cultivo ajustado se inoculó sobre Agar Mueller-Hinton, en placas petri, con la técnica de hisopo; secos los discos, se colocaron sobre el inóculo en agar incubándolos a 30° C y 24 horas posteriores se procedió a la lectura de los halos de inhibición correspondientes<sup>59,60,61</sup> (anexo B.3).

### 3.2.3. Concentraciones mínima inhibitoria y mínima bactericida de los extractos

Las pruebas de concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) se realizaron simultáneamente y en dos partes, por la modificación del método de difusión de disco en agar descrito por el NCCLS en las cepas referidas con anterioridad.

#### PROCEDIMIENTO:

Primero, se determinaron las concentraciones de las soluciones "madre" (anexo B.2) de cada extracto y su control (OTC), a partir de cada solución "madre" se obtuvieron diluciones dobles seriadas, para impregnar grupos de discos de papel filtro (Whatman 3) con 20 µl de cada dilución del EAF, otros cada dilución del EAL, un tercer grupo con cada

dilución del EE y en el cuarto grupo con cada dilución de OTC base, para dejarlos secar en una campana de flujo laminar por 5 minutos.

Por otra parte, se prepararon cultivos frescos ajustados a la concentración 0.5 del nefelómetro de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC / mL) El cultivo ajustado se inoculó sobre agar Mueller-Hinton y en agar nutritivo, usando la técnica de hisopo; secos los discos, se colocaron sobre el inóculo en agar incubándolos a 30° C y 24 horas posteriores se procedió a la lectura de los halos de inhibición correspondientes <sup>59,60,61</sup> (anexo B.4).

Obtenidos los datos de sensibilidad a los extractos y concentraciones mínimas inhibitoria sobre las cepas de referencia y las de nuestro interés, se realizaron dos pruebas, una para comprobar el efecto inhibitorio de los extractos en diferentes cepas bacterianas a la menor concentración establecida con anterioridad y la segunda para determinar el tiempo de la actividad bactericida de los extractos sobre las cepas de *Aeromonas* sp.

#### **3.2.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)**

Se realizó siguiendo las técnicas descritas en el manual NCCLS <sup>59</sup>, Alderman y Smith <sup>60</sup> y la FDA <sup>61</sup>. Se emplearon cuatro diluciones dobles seriadas iniciando con la solución "madre" (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16) del EAF de ajo con la técnica de difusión de disco en agar, sobre las 48 cepas bacterianas además de las 5 de referencia (anexo B.1).

#### **3.2.5. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB)**

Se propuso evaluar la actividad bactericida del extracto de ajo al 99% de las UFC en función del tiempo, así mismo, examinar el rango de diluciones a la cual el extracto mostraba la actividad bactericida.<sup>59</sup>

##### **PROCEDIMIENTO:**

Una vez obtenida la CMI, se seleccionaron 3 cepas de *Aeromonas hydrophila*, las cuales mostraron resistencia, sensibilidad moderada y marcada. Se obtuvieron cultivos puros (24 hrs) sembrados en agar sangre, con la cosecha de los cultivos, se prepararon los inóculos, ajustados la concentración 0.5 de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/ mL) con SSF; enseguida, se prepararon dos tipos de suspensiones, la llamada tratamiento ( $T_x$ ) que

consistió de  $\frac{3}{4}$  partes de inóculo en  $\frac{1}{4}$  parte del EAF y la otra, llamada control ( $C_x$ ), consistió de  $\frac{3}{4}$  partes de inóculo en  $\frac{1}{4}$  parte de amortiguador de fosfatos.

De cada suspensión, se realizaron dos diluciones en pasos (1:1000) y se tomó 1 mL de la segunda dilución para incluirla en agar TSA (Agar Trypticosa Soya) dentro de una caja petri; referencia al tiempo cero ( $T_0$ ) Pasados 30 minutos, se procedió de la misma forma, esto es: de cada suspensión ( $T_x$  y  $C_x$ ), se realizaron dos diluciones en pasos (1:1000) y se tomó 1 mL de la segunda dilución para incluirla en agar TSA dentro de una caja petri; referencia al tiempo uno ( $T_1$ ), hasta completar 4 tiempos (120 minutos) con intervalos de 30 minutos. El ensayo anterior se realizó por triplicado para cada suspensión (anexo B.5).

### **3.3. Fase Tres**

Engloba las pruebas en organismos vivos bajo sistemas de laboratorio para determinar la eficacia del extracto de ajo en una infección. Llevado a cabo en el departamento de especies no tradicionales (área acuícola), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

#### **3.3.1. Instalaciones**

Se prepararon 18 acuarios de 14 Litros de capacidad, equipados con termómetros, calentadores (25 w) y oxigenados mediante un sistema de oxigenación constante hecho de tubo PVC, una bomba ( $\frac{1}{4}$  HP), manguera y piedras difusoras para acuario.

La capacidad de organismos que sostenía el sistema de acuarios era no mayor a 180; por lo que es importante señalar que el experimento se realizó en tres bioensayos y en cada uno se hizo limpieza, desinfección de equipo, así como de cloración de agua por oxigenación días previos a cada bioensayo.

#### **3.3.2. Material biológico**

Se utilizaron 540 peces (*Oreochromis* sp.) con pesos promedio de  $5.0 \pm 2.4$  gramos; organismos donados por la Universidad Autónoma de Chapingo Texcoco, Edo. de México y por la piscifactoría "El Rodeo" ubicado en Zacatepec, Edo. de Morelos.

Transportados en bolsas de plástico con 1/3 de agua y 2/3 de oxígeno; los organismos arribaron a estanques de fibra de vidrio (1150 L aprox.). Después de 24 horas, se alimentaron con comercial balanceado a razón del 2-3% de la biomasa total.<sup>62</sup>

### 3.3.3. Prueba de desafío

Se realizaron suspensiones de cultivos frescos de *A. hydrophila* en solución salina fisiológica (SSF), ajustados la concentración 0.5 de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC / mL).

En una área de 60 cm de esterilidad (con mechero) en la mesa de trabajo, se pescaron con red, grupos de 18 organismos al azar, para después anestésarlos con "Alka-seltzer"<sup>®</sup>  $\gamma$  y hacer una laceración circular con bisturí a cada organismo (3 - 5 mm de diámetro), localizada en el costado caudal izquierdo desde línea media hacia la aleta anal retirando escamas y piel hasta llegar a músculo y obtener sangrado. Con hisopos estériles empapados de la suspensión bacteriana se realizó la inoculación a cada pez con excepción de 60 organismos dispuestos para controles, a los cuales sólo se realizó la lesión.

La siembra de peces en cada acuario estuvo por densidades de 1 pez x 1.5 L de agua esto fue, 10 peces por pecera, que corresponde a 50 gramos de biomasa por acuario con un total de 180 peces por bioensayo. Posterior al manejo, se esperó la manifestación de signos por 24 horas.

### 3.3.4. Terapéutica

La distribución de las peceras en los bioensayos 2 y 3, se realizó de la siguiente manera  $\phi$  <sup>63</sup> (anexo C.1):

- I1–I3 Control positivo (inóculo)
- M1–M3 Control (manejo)
- T1–T3 Control de toxicidad (ajo)
- B1–B3 Extracto estabilizado (Biodegerm<sup>®</sup>)
- A1–A3 Extracto acuoso (fresco)
- O1–O3 Control negativo (OTC)

---

$\gamma$  Cedillo PC. Técnica de Necropsia en Peces / Toma y Envío de Muestras. Memorias del II Curso sobre Enfermedades de Peces de Ornato; 1999 abril 22 - 23; México (D. F.). México (D. F.): Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios, 1999: 43-50.

$\phi$  Para el primer bioensayo, se sustituyó el tratamiento con Biodegerm<sup>®</sup> y sus repeticiones por el tratamiento con ajo, sin modificar la distribución de los demás tratamientos.

Donde:

Control positivo (I).- contenía organismos lacerados e inoculados sin terapia.

Manejo (M) .- se realizó únicamente manejo de organismos incluyendo laceración.

Control de Toxicidad (T) .- los organismos fueron lacerados y expuestos únicamente a extracto acuoso fresco de ajo.

Con respecto a los organismos dosificados, todos recibieron el mismo manejo y las dosificaciones se realizaron como sigue:

EAF del Ajo (A) .- 200 ppm de extracto X Litro de agua.

EE -Biodegerm<sup>®</sup>- (B) .- mismo criterio que el anterior.

OTC (O) .- a razón de 20 mg X Litro de agua.

Los tratamientos fueron administrados en el agua cada 24 horas por tres días, se realizaron registros de calidad de agua tales como, temperatura, oxígeno disuelto en agua y pH. Paralelamente, se registró la mortandad de cada acuario.<sup>7</sup>

### **3.3.5. Incidencia de infección**

Además de los valores de sobre vivencia y calidad del agua se realizaron procedimientos bacteriológicos, serológicos así como histopatológicos para determinar el efecto del extracto de ajo, basados en la incidencia de infección en peces.

#### **3.3.5.1. Re-aislamiento bacteriano**

De los peces sobrevivientes de todos los tratamientos del experimento completo, se tomaron muestras directas de lesión, branquias y cavidad celómica bajo un campo estéril y con un asa estéril; siguiendo la técnica descrita por Collins,<sup>64</sup> cada asada se estrío directamente por el método de agotamiento progresivo y continuo del inóculo sobre agar de tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) y MacConkey. Incubados por 24 horas a 37 ° C, se tomó una muestra de colonias aisladas para almacenarlas en viales con gelosa especial a un pH de 8.6.<sup>59,60,61</sup>

### 3.3.5.2. Prueba de citocromo c oxidasa

El objetivo de ésta prueba bioquímica fue determinar la presencia o ausencia de la citocromo c oxidasa en las cepas, lo cual permite diferenciar el grupo *Enterobacteriaceae* que carecen de citocromo c de los géneros *Pseudomonas* y *Aeromonas* que si lo contienen. Esta prueba bioquímica se basa en la capacidad del colorante (tetrametil-p-fenilendiamonio) para oxidarse al contacto con la citocromo c, produciendo una coloración azul- violeta intenso.

#### PROCEDIMIENTO:

Se requirieron de cultivos frescos de todas las cepas reaisladas de peces a identificar, así como cepas de referencia identificadas. En una caja petri de 10 cm de diámetro, se vertieron 10 mg de tetrametil-p-fenilendiamonio disueltos en 5 mL de agua destilada; enseguida se introdujo papel Whatman no.3 impregnado en su totalidad con la solución, enseguida se tomó una asada de cada cultivo fresco, se untó sobre una pequeña superficie del papel para realizar la lectura 10 segundos después.

### 3.3.5.3. Serología

La especificidad en el reconocimiento del antígeno por los anticuerpos y la posibilidad de obtenerlos frente a diversas moléculas lleva a la utilización de métodos inmunológicos con el objeto de evaluar la presencia de la cepa bacteriana inoculada en los peces y comprobar el efecto bactericida de los tratamientos. La metodología seguida se explica en los siguientes puntos:

a) Toma de muestras, obtención y conservación de cultivos puros. De los peces sobrevivientes de todos los tratamientos, se tomaron muestras directas de la lesión, branquias y cavidad celómica bajo un campo estéril y con una asa estéril; siguiendo la técnica descrita por Collins,<sup>64</sup> cada asada se estrió directamente por el método de agotamiento progresivo y continuo del inóculo sobre agar de TCBS y MacConkey. Se incubaron a 37° C por 24 horas y posteriormente, se tomó una muestra de colonias aisladas para conservarlas en gelosa especial, a un pH de 8.6.<sup>60</sup>

b) Antígeno. Para preparar el antígeno, se siguió la metodología descrita por Sakazaki *et al.*,<sup>65,66</sup> de un cultivo fresco (24 horas) de *A. hydrophila* (ATCC 49140) crecido en agar soya, se realizó una suspensión en solución salina (0.15 M), calentándola a 100° C

con 5 Lb de presión a vapor fluyente por 2 horas, se realizó el lavado del antígeno centrifugando (7000 rpm / 10 min) y decantando el sobrenadante tres veces. Lavado el antígeno, se ajustó al valor 3 del nefelómetro de McFarland ( $9 \times 10^8$  UFC / mL). Finalmente, se agregó una solución de formaldehído al 0.3% como fijador y se reservó en refrigeración (20° C) dentro de un frasco estéril, sellado herméticamente.

c) Obtención de suero de conejo contra antígenos de *A. hydrophila* (ATCC 49140).

La obtención del suero fue esencial para su utilización posterior en la identificación por serología de la cepa inoculada en los peces.

PROCEDIMIENTO:

Por su facilidad de manejo, la posibilidad de obtener un volumen considerable de sangre y su adecuada estimulación para obtención de anticuerpos específicos, el conejo (Nueva Zelanda) fue el animal de primera elección para este trabajo.<sup>66</sup>

Inmovilizado el conejo adulto, se procedió a la inmunización intravenosa (vena marginal de la oreja) con jeringas de insulina, el protocolo de administración del antígeno se describe en el anexo C.2. Para el día 27, se procedió a la extracción de sangre vía intravenosa (arteria central de la oreja) en tubos estériles.

Extraída la sangre, se dejó coagular durante dos horas a temperatura ambiente. Formado el coágulo, se desprendió del tubo con un palillo de madera para dejarlo reposar a 4° C por 24 horas y permitir la retracción total del mismo. Se decantó el suero en un tubo para enseguida centrifugarlo (2000 rpm) durante 20 min. El suero sobrenadante fue tomado con una pipeta Pasteur y distribuido en viales pequeños.<sup>66</sup>

d) Microaglutinación en microplaca de 96 pozos. Basado en la aglutinación de los antígenos con anticuerpos específicos como todos los anti-sueros O preparados con *A. hydrophila* conteniendo anticuerpos contra un antígeno rugoso; en virtud que previo al uso de anti-suero OR para diagnóstico, este debe ser absorbido con un antígeno OR, fue realizado el procedimiento nombrando al producto: "*Suero Absorbido*" (SA).<sup>66</sup> Seguido, se realizó la titulación de los sueros de *A. hydrophila* (ATCC 49140) de la siguiente manera:

Se obtuvo un cultivo fresco de *A. hydrophila* (ATCC 49140). Con la cosecha bacteriana se realizó una suspensión en formalina al 0.6%. Para desnaturalizar los péptidos del complemento presentes en el SA, fue necesario incubarlo en un baño maría a 56° C

durante 30 minutos; del suero absorbido sin complemento (SAD) se realizó una primera dilución 1:10 de SAD : SSF.

Por otra parte, en la microplaca de 96 pozos, se añadieron 50 µl de SS a partir del pozo dos de la primera columna. Además de 50 µl de la primera dilución del SAD más 50 µl de la suspensión bacteriana en el pozo "1.A".

Las diluciones dobles seriadas se realizaron a continuación tomando 50 µl del pozo 1 y pasados al número 2; se homogeneizó y se repitió la operación pozo tras pozo hasta llegado el pozo 12 de la columna; el volumen final de todos los pozos fue de 50 µl.

Se incubó a 50° C por 12-18 hrs para después efectuar la lectura de los resultados y con ello la titulación del suero. Si el antígeno no es aglutinado por los anticuerpos, formarán un "botón" en el fondo del pozo.

Esta metodología se repitió con cada una de las cepas bacterianas a reconocer con el suero titulado.<sup>66</sup>

e) Aglutinación en portaobjetos. Para visualizar la reacción de las bacterias con los anticuerpos, se usó la técnica en portaobjetos. Se realizaron diluciones dobles seriadas del suero para titularlo. Seguido, se colocaron sobre portaobjetos 20 µl del antígeno (suspensión bacteriana de *A. hydrophila* (ATCC 49140) en SS) y se confrontaron con las diluciones del suero. Se mezclaron con un movimiento constante de rotación para después observar la reacción de aglutinación (entre 60 y 120 segundos) y determinar el título. Titulado el suero, éste procedimiento se repitió en todas las cepas que se realsaron y conservaron anteriormente.<sup>66</sup>

#### **3.3.5.4. Histopatología**

Para evaluar las lesiones y el proceso de reparación de éstas en los organismos tratados, el procedimiento seguido se describe en los siguientes puntos:

a) Toma de muestras. Debido a que los tejidos de los peces se autolisan rápidamente, al inicio y al final de cada bioensayo se practicó eutanasia a una muestra de especímenes de cada uno de los tratamientos, primero, se puncionó con una aguja de disección entre la base de la calavera y la primera cervical, para luego seccionar la médula espinal justo por detrás del cráneo con una hoja de bisturí. Se fijaron los tejidos de inmediato con formalina amortiguada (pH 7.2) al 10%, internamente en cavidad celómica

con una jeringa de insulina a cada organismo así como externamente sumergido en un volumen 9 veces (aproximadamente) mayor a su peso. Las muestras (peces) fueron trasladadas al Departamento de Patología para realizar las necropsias y realizar cortes de la lesión, incluidos piel y músculo.<sup>67</sup>

b) Preparación de Tejidos. Las muestras de tejidos fueron procesados mediante la técnica de inclusión en parafina. De los cubos (1 cm<sup>2</sup>) se cortaron secciones de 5 µm de grosor. Para luego teñirlas con Hematoxilina y Eosina (H & E). Cada corte teñido se montó por separado en portaobjetos, resina y cubreobjetos, creando así una laminilla por corte.

c) Diagnóstico. Las lesiones microscópicas fueron observadas en microscopio óptico bifocal con objetivos 10x, 40x, 100x y oculares 10x con plataforma móvil, condensador ajustable y sistema de iluminación incorporado regulable.

Los hallazgos histopatológicos de las muestras de organismos sobrevivientes tomadas a partir de los lotes de los distintos tratamientos durante la fase tres del experimento, en ambos procesos infecciosos (agudo a crónico) de la septicemia hemorrágica, las lesiones en piel por *A. hydrophila*, inician con dermatitis, seguido de una extensa necrosis hemorrágica hasta llegar al músculo. Basados en esto y la hipótesis planteada, los criterios de evaluación en piel y músculo (área lacerada) se basaron en la presencia o ausencia de: 1.- bacterias, 2.- reacción inflamatoria (celular), 3.- cambios patológicos tisulares (necrosis) y 4.- procesos de reparación histológica (vasos de neoformación y fibrosis).<sup>68</sup>

### 3.4. Análisis estadísticos

Dentro de cada fase se analizaron estadísticamente los resultados, según fue requerido.<sup>69,70</sup>

#### 3.4.1. Concentración mínima inhibitoria

Se realizaron análisis de varianza a partir de un diseño completamente aleatorio para estimar y probar la hipótesis de desigualdad entre las medias de los halos de inhibición de crecimiento producidos en 83 cepas de *Aeromonas* sp.

Siguiendo el modelo estadístico  $X_{ij} = \mu + \tau_i + e_{ij}$

Donde:  $i = 1, 2, 3, 4, 5$  y  $6,$

$j = 1, 2$  y  $3,$

$X_{ij}$  = Valor de la zona inhibitoria de crecimiento por cepa,  
 $\mu$  = Gran media de todas las zonas inhibitorias del crecimiento bacteriano,  
 $\tau_i$  = El efecto del tratamiento (extracto) y  
 $e_{ij}$  = Todas las fuentes de variación no controladas.

### 3.4.2. Concentración mínima bactericida

Se realizaron análisis de varianza de un factor a partir de un diseño completamente aleatorio para estimar y probar la hipótesis de desigualdad entre las medias de los Log<sup>10</sup> de las UFC crecidas en cada cepa sometida a dos tratamientos en distintos tiempos.

Siguiendo el modelo estadístico  $X_{ij} = \mu + \tau_i + e_{ij}$

Donde:  $i = 1, 2, 3, 4, 5$  y  $6,$

$j = 1, 2$  y  $3,$

$X_{ij}$  = UFC crecidas por tratamiento (extracto y PBS) a un tiempo,

$\mu$  = Gran media de las UFC crecidas por tratamiento a un tiempo,

$\tau_i$  = El efecto del tratamiento en un tiempo determinado y

$e_{ij}$  = Todas las fuentes de variación no controladas.

### 3.4.3. Características físico químicas del agua

Para evaluar la homogeneidad de la calidad del agua de cada bioensayo y cerciorarnos que esto u otros factores inherentes no interfirieran en los resultados de la terapéutica evaluada en éste estudio, se realizaron análisis de varianza por bioensayo y entre bioensayos.

Siguiendo el modelo estadístico  $X_{ij} = \mu + \tau_i + e_{ij}$

Donde:  $i = 1, 2, 3, 4, 5$  y  $6,$

$j = 1, 2$  y  $3,$

$X_{ij}$  = Valor del parámetro registrado (temperatura, OD o pH),

$\mu$  = Constante desconocida,

$\tau_i$  = Efecto del parámetro,

$j = J$ -ésimo parámetro,

$e_{ij}$  = Error y las fuentes de variación ajenas.

### 3.4.4. Mortalidad

Primero, se buscó determinar la independencia de mortalidad de peces con los tratamientos a dos niveles con cuadros de contingencia (2x2);

Esto es:

- a. = número de peces vivos de la terapéutica A
- b. = número de peces vivos de la terapéutica B
- c. = número de peces muertos de la terapéutica A
- d. = número de peces muertos de la terapéutica B
- e. = número total de observaciones de la terapéutica A
- f. = número total de observaciones de la terapéutica B
- g. = número total de observaciones del resultado vivos
- h. = número total de observaciones del resultado muertos
- i. = número total de observaciones

Notación estándar para cuadro 2x2

Resultado	Terap. A	Terap. B	Total
Vivos	a	b	g
Muertos	c	d	h
<b>Total</b>	e	f	i.

Segundo, la prueba de independencia, esto fue, comparar las diferencias entre el número de observaciones de cada celda con los números esperados;

Siguiendo el modelo estadístico

$$\chi^2 = \sum \frac{(O-E)^2}{E} \quad \text{Con g.l.} = n - 1 \text{ categorías}$$

Donde: O = valores observados y  
E = valores esperados.

Tercero, finalmente se precisó la asociación entre tratamientos y mortandad con la prueba exacta de Fisher.

Siguiendo el modelo estadístico 
$$P = \frac{(g)!(h)!(e)!(f)!}{a!b!c!d!i!}$$

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Fase Uno

#### 4.1.1. Pruebas químico analíticas en extractos.

Se obtuvieron cuatro extractos, el extracto macerado (EM), el extracto liofilizado (EAL), el extracto acuoso fresco (EAF) además del extracto estabilizado (EE (Biodegerm<sup>®</sup>)) mismos con los que se realizaron cromatografías en placa fina (CPF) para determinar de manera general su contenido.

Basados en la correspondencia de polaridad, tamaño, color e intensidad de manchas cromatográficas dadas por los estándares, se tomó como referencia la cromatografía en placa fina realizada con el extracto liofilizado en cuatro disolventes (figura 4). La placa expone al EAL disuelto en agua como manchas claras y amplias de colores amarillo y naranja que corresponden a productos derivados del sulfoxido de cisteína y fucsia, magenta, violeta u ocre colorido de los derivados del amino ácido cisteína. En el EAL disuelto en metanol, se observa la misma distribución de manchas con menor tamaño, de colores amarillo, fucsia y violeta. Asimismo el EAL disuelto en dicloro metano sólo mostró una pequeña mancha de color amarillo y el EAL disuelto en acetato de etilo no exhibe manchas cromatográficas en la placa, lo que indica volatilidad de compuestos con los disolventes.

Al realizar cromatografía en placa fina de los EAL, EM, EAF y EE (figura 5), se observó que el EE no muestra manchas cromatográficas, el extracto de ajo macerado EM muestra manchas de color amarillo y ocre pálido (derivados del sulfoxido de cisteína) y colores rosa claro y violeta (derivados del amino ácido cisteína), seguido del EAL disuelto en agua, que revela manchas tenues de color amarillo con diferente polaridad entre sí, así mismo el EAF se mostró manchas de colores amarillo (derivados del sulfoxido de cisteína), rosa, violeta y ocre (derivados del amino ácido cisteína).

Dada la nulidad en manchas que el EE mostró en el cromatograma, se realizó el revelado con sulfato cérico en dicha placa (figura 6), reveladas tres manchas color café claro en el EE y manchas café más intenso en los EM, EAL y EAF.

En virtud que se ocuparon EE y EAF en fases posteriores, se realizaron placas cromatográficas de estos para compararlas con la CPF de referencia, a lo que se observo

que el EAF muestra manchas cromatográficas colores rosa, violeta (derivados del amino ácido cisteína), ocre y amarillo (derivados del sulfoxido de cisteína), en tanto el EE no revela manchas aparentes (figura 7).

Por otra parte de todos los extractos acuosos usados posteriormente, se observaron patrones similares de coloración y posición de manchas, con colores violáceos (derivados del amino ácido cisteína) y naranja (derivados del sulfoxido de cisteína) principalmente. También se observó disminución de estas manchas en extractos refrigerados y diferente cantidad o tamaño entre extractos. Lo que indica mayor cantidad de metabolitos secundarios en extractos nuevos (figura 8).

Cabe mencionar, que para los extractos acuosos EAF y EAL, se obtuvieron rendimientos de 25-27% base húmeda (BH) y de 1.4-1,6% base seca (BS).

## **4.2. Fase Dos**

### **4.2.1. Sensibilidad de cepas de *Aeromonas* sp.**

Se observó la sensibilidad de las cepas de referencia y *A. hydrophila* confrontadas con los extractos; encontrado que el EM no provocó ningún efecto sobre las cepas utilizadas; de los extractos restantes, el EAL registró poco efecto inhibitorio sobre las cepas, seguido del EAF, el EE que mostró mayores efectos inhibitorios comparados con el efecto de la OTC (cuadro 1).

### **4.2.2. Concentración mínima inhibitoria de los extractos.**

Observado el efecto de los distintos extractos sobre las bacterias, se determinó la concentración mínima inhibitoria del EAF a cinco diluciones en 53 cepas de *Aeromonas* sp. y de referencia.

De las 48 cepas de *Aeromonas* se observaron halos de inhibición en todas las diluciones, esto es que frente al EAF 1:1 el 98% de cepas mostraron valores de 19 – 34 mm de zona inhibitoria y el 2% restante de 15 – 18 mm. En diluciones 1:2 del EAF, el 82% de cepas produjeron tamaños de halos inhibitorios entre 19 – 30 mm, el 12% halos de 15 – 18 mm y el 6% de cepas mostró valores de halos inhibitorios  $\leq 14$  mm; con diluciones 1:4 de EAF, el 19% de cepas de *Aeromonas*, registraron zonas de inhibición de crecimiento de 19 – 26 mm, el 33% de 15 – 18 mm y el 48% tamaños  $\leq 14$  mm; para la

dilución 1:8 el 2% registró anillos de 23 mm, un 8% entre 15 –18 mm y el 90% restante originaron valores de zonas de inhibición  $\leq 14$  mm. A diluciones 1:16 de extracto acuoso fresco, se registro un 2% de cepas con tamaños de halos inhibitorios de 20 mm y el 98% restante registro zonas de 17 – 6 mm (cuadro 2).

Acerca de las cepas de referencia, se observó que la *Pseudomonas aeruginosa* no se inhibió ( $\leq 14$  mm) ante ninguna dilución, la *Streptococcus faecalis* tuvo zonas de inhibición  $\leq 14$  mm ante todas las diluciones excepto al extracto sin diluir (1:1). En la cepa de *Staphylococcus aureus* los valores de los halos inhibitorios registrados fueron de 57 y 21 mm ante el EAF 1:1 y 1:2 respectivamente, así como,  $\leq 14$  mm en el resto de las diluciones. En *Escherichia coli* (ATCC 25922), a medida que las diluciones aumentan, el efecto observado desciende, esto es que a diluciones 1:1 y 1:2 los valores registrados son  $\geq 19$  mm; a diluciones intermedias (1:4) entre 15 –18 mm y a diluciones mayores (1:8 y 1:16) los tamaños de zonas inhibitorias son menores o iguales que 14 mm. Sin embargo se observa que la *Escherichia coli* cepa K12 14RS19 solo se inhibe ante el EAF 1:1 con valores de 58 mm de zona inhibida y al resto de las diluciones dichas zonas son  $\leq 14$  mm.

#### **4.2.3. Concentración mínima bactericida.**

Al respecto, el EAF a 40 $\mu$ g / disco, provocó sensibilidad marcada en el 93% de cepas de *A. hydrophila* y en el 100% de cepas de *A. caviae*, *A. trota*, *A. veronii* y *A. v. b. sobria*. Este mismo extracto a 20 $\mu$ g tiene efecto bactericida en el 76% de *A. hydrophila*, el 100% de las cepas de *A. caviae* y *A. veronii*, el 83% de las cepas de *A. trota* y el 67% de cepas de *A. v. b. sobria*. No obstante, a concentraciones 10 $\mu$ g el EAF provocó sensibilidad moderada en el 24% de las cepas de *A. hydrophila*, en el 33% de *A. caviae*, en el 50% de *A. trota* y *A. veronii* y en el 67% de cepas de *A. v. b. sobria*. Se observó también que a menor concentración (5 y 2.5  $\mu$ g) del EAF las *Aeromonas*, son moderadamente sensibles o resistentes (cuadro 3).

Comparados los tratamientos a 20  $\mu$ g / disco, se distinguió que para *A. hydrophila* (ATCC 49140) y *A. v. b. sobria* (ATCC 102831) el efecto bactericida de la OTC es igual al del EAF y el EE con  $p > 0.05$ ; para *A. caviae* (ATCC 88784) el efecto del EE es igual al de la OTC con  $p > 0.05$ , así como, para *A. trota* (ATCC 102811) es el mismo efecto entre el EAF y

la OTC ( $p > 0.05$ ). En tanto la comparación del efecto entre los extractos y la OTC en la cepa de *A. veronii* (ATCC 98632) tuvo diferencias significativas con una  $p < 0.05$ .

En cuanto a las cepas de referencia, el efecto bactericida en *P. aeruginosa* (ATCC 27853) de EAL, EE y OTC estadísticamente no tiene diferencias significativas ( $p > 0.05$ ); para *S. faecalis* (ATCC 29212) y *S. aureus* (ATCC 25923) el efecto bactericida de OTC y el EE es el mismo con  $p > 0.05$ . En tanto que, no existen diferencias ( $p > 0.05$ ) entre el efecto bactericida del EAF, EE y OTC en *E. coli* (ATCC 25922). Así como, el efecto del EAL y el EE es igual ( $p > 0.05$ ) sobre *E. coli* (K12 14RS19), no obstante, el resultado difiere ( $p < 0.05$ ) entre EAF y OTC y los anteriores para la misma cepa (cuadro 4).

Conforme a los rangos establecidos de sensibilidad para cepas de referencia a las tetraciclinas (cuadro 5), y de la comparación entre tratamientos, se encontró que la cepa de *P. aeruginosa* (ATCC 27853) es resistente a los extractos EAL, EAF, EE y OTC. La cepa *S. faecalis* (ATCC 29212) es resistente al extracto liofilizado y al extracto acuoso fresco de ajo, así como, sensible al Biodegerm® y las OTC. Para la *E. coli* (ATCC 25922) el EAL no genera reacción bactericida, no así los extractos acuoso fresco y estabilizados, a los que dicha cepa es moderadamente sensible. Así mismo, la resistencia hacia el EAL, EE Y EAF de *E. coli* (K12 14RS19).

Respecto de la sensibilidad de las cepas de *Aeromonas* y basados en los rangos establecidos de sensibilidad a las tetraciclinas para cepas de referencia, en la figura 9 se observa que el extracto liofilizado no tiene efecto bactericida en ninguna cepa de *Aeromonas*; el Biodegerm® produce efectos de sensibilidad en *A. hydrophila* (ATCC 49140) y *A. caviae* (ATCC 88784), sensibilidad moderada en *A. v. b. sobria* (ATCC 102831) y franca resistencia en *A. veronii* (ATCC 98632) y *A. trota* (ATCC 102811). También se observo que el extracto acuoso fresco de ajo (EAF) induce sensibilidad moderada en las cepas de *Aeromonas* usadas en el presente trabajo, excepto la cepa de *A. trota* (ATCC 102811), debido a su resistencia.

Los porcentajes de sobre vivencia de *Aeromonas* a distintos tiempos (figura 10) exponen que a las 3 horas existen 0.4% de células sobrevivientes de *A. v. b. sobria* (ATCC 102831); para dos y media horas de exposición con el EAF, el porcentaje de mortandad de *A. hydrophila* (ATCC 87720) es del 100%, así mismo, a partir de los primeros 30 minutos,

la tasa de mortandad en *A. hydrophila* (ATCC 49140) es mayor al 99.9% manteniéndose hasta 3 horas posteriores a la exposición con el EAF.

Al análisis estadístico en la determinación de velocidad del EAF para matar bacterias (cuadro 6), no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre el EAF y el control (PBS) al tiempo cero, sin embargo no se observó igualdad ( $p < 0.05$ ) entre estos a tiempos adyacentes. Asimismo, no se observaron diferencias ( $p > 0.05$ ) entre tiempos para el PBS y las tres cepas. En la figura 11 se observa la correlación entre la velocidad del efecto bactericida del EAF en *A. hydrophila* (ATCC 49140) y el tiempo, comparado con el control.

### **4.3. Fase Tres**

#### **4.3.1. Calidad del agua.**

Los promedios de los parámetros físicos y químicos de los acuarios, se muestran en la figura 12, observando rangos de 27 – 29 ° C para temperatura, entre 7.4 y 7.6 para pH y 2.8 – 4.8 mg / l de oxígeno disuelto en agua (OD). Estos valores se sometieron a análisis de varianza (cuadro 7) entre tratamientos y entre bioensayos (cuadro 8). Los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos para cada parámetro ( $p > 0.05$ ), pero si existen diferencias entre bioensayos ( $p < 0.05$ ).

#### **4.3.2. Mortalidad.**

Basados en el número de organismos finales de cada tratamiento en relación con los organismos existentes antes de las terapias (cuadro 9) y del ajuste de proporciones a porcentajes de mortalidad (cuadro 10), se observó que la mayor proporción de mortalidad registrada fue a causa del Biodegerm® con 96%, seguido del tratamiento llamado toxicidad con 45%, ajo o extracto de ajo (EAF) 34%, manejo 11% y por último, con menor porcentaje de mortalidad para organismos infectados con 8% y para el tratamiento con OTC 8%, estos valores se muestran en el cuadro 10.

Los porcentajes se sometieron a la prueba exacta de Fisher (cuadro 11) para comparar tratamientos por parejas. Es importante mencionar que el criterio para calcular la tasa de mortalidad, estuvo dirigido a evaluar el efecto de los tratamientos basados en la

sobre vivencia de organismos, sin embargo los resultados muestran que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos confrontados con el Biodegerm<sup>®</sup>, esto sugiere problemas graves de toxicidad bajo las condiciones ambientales, posología y suministro manejadas en el presente trabajo; de la misma manera, las diferencias ( $p < 0.05$ ) entre las tasas de mortalidad de los organismos no expuestos (OTC, manejo e infectados) y los expuestos a los extractos (toxicidad y ajo), exponen efectos tóxicos en los peces inmersos en extracto de ajo a razón de 2800  $\mu\text{L}$  por litro de agua. Sin embargo, el efecto letal del Biodegerm<sup>®</sup>, es mayor que del extracto de ajo ( $p < 0.05$ ). Por otra parte, los grupos llamados infectados y manejados, comparados entre sí no manifiestan diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ); suceso que señala al factor estrés como desencadenante de cuadros morbosos letales como la septicemia hemorrágica.

#### **4.3.3. Incidencia de infección.**

Bacteriológico. Al final del experimento de desafío y terapéutica, se reaislaron 81 cepas de los peces pertenecientes a los grupos terapia (A y B) y grupos control (M, T, I y OTC).

De las 81 cepas, 12 se extrajeron de cavidad celómica, 36 de branquias y 33 de zona epitelial lacerada. Para diferenciar las enterobacterias de las *Aeromonas*, se realizó la prueba bioquímica de citocromo C oxidasa. Encontrándose que 79 de las 81 cepas fueron positivo a la prueba de oxidasa y las 2 cepas restantes negativo.

De las cepas provenientes de zonas laceradas de los peces, una oxidasa negativa se aisló del grupo terapia B (Biodegerm<sup>®</sup>) y 32 cepas oxidasa positivas de todos los grupos (cuadro 12). De manera que, el 97% (32/33) de cepas aisladas de las zonas laceradas de todos los tratamientos, fueron identificadas como pertenecientes al género *Aeromonas* y el 3% (1/33) restante se reconocen como enterobacterias.

Serológico. Para identificar la especie (*A. hydrophila* (ATCC 94140)), se confrontaron las cepas con el suero de conejo bajo las técnicas de aglutinación en microplaca y portaobjetos.

Con la técnica de aglutinación en microplaca, se registraron dos de las 81 cepas reaisladas, con reacción positiva a *A. hydrophila*; ese 20% (2/10) de cepas positivas provenían de la laceración de organismos infectados no tratados (cuadro 12).

Respecto de las cepas que reaccionaron con el suero de conejo en portaobjetos (cuadro 12), se observó que el 40% (4/10) de cepas re-aisladas de organismos infectados sin tratamiento fueron identificadas como *A. hydrophila* (cuadro 12).

Histopatológico. El propósito de recurrir a observaciones histopatológicas que evidenciaran procesos adyacentes a la sucesión de modificaciones que se presentan después de una agresión en piel. De manera práctica se enuncian dentro de los cuadros 13 y 14 las proporciones de los procesos más frecuentes observados en los cortes histológicos observados.

Dentro de los hallazgos en tejidos se observaron células caliciformes o globosas, primera barrera de defensa ante las agresiones físicas o químicas en piel, presentada por más del 50% de peces muestras de ambos grupos; células epitelioides o de Malpigia, al respecto observamos que entre 80 – 100% de organismos pertenecientes a los grupos control y terapia tuvieron este hallazgo; melanomacrófagos también llamados "black spot", encontrados en más del 90% de los organismos y monocitos hallados en menos del 50% de los organismos. El hallazgo de linfocitos se observó en más del 90% de los organismos.

En proporciones del 50 – 80% de casos se observaron tejido conjuntivo y vasos de neoformación componentes principales para el proceso de reparación y cicatrización (figuras 14-28).

Se advirtieron también procesos degenerativos y hemorragias en proporción de organismos menor al 50%, así como necróticos en algunas zonas lesionadas de la capa muscular en no más del 30% de los organismos (figuras 14-28).

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Mecanismo de extracción.

La obtención del extracto macerado (EM) fue reproducible para grandes cantidades, observándose manchas de colores bien definidos en la cromatografía en placa fina, manchas representativas de los principales metabolitos precursores de la alicina mencionados por Wagner<sup>69</sup>.

Respecto de los extractos de ajo acuoso liofilizado (EAL) y fresco (EAF), la extracción fue estandarizada y reproducible con rendimientos de 25% para EAF de ajo BH y 1.5% para EAL de ajo BS, porcentajes similares a los observados por Cavallito,<sup>28</sup> Reuther *et al.*<sup>30</sup> Los pasos básicos constantes dentro de la técnica fueron tres: molienda, centrifugado y filtrado; puntos concordantes con los trabajos de Caporaso *et al.*<sup>71</sup> y Monira *et al.*,<sup>72</sup> salvo pequeñas diferencias como el filtrado a tres tiempos, forma, tiempo de mezclado y condiciones de almacenaje, que se realizaron de manera más precisa en este trabajo.

Por otra parte, la separación de los compuestos activos presentes en los extractos de ajo liofilizado y extracto acuoso fresco por cromatografía en placa fina (CPF), se presentan de manera cualitativa y sin separación clara de cada fracción, no obstante, los colores están definidos por zonas que muestran los principales compuestos como sulfoxidos de cisteína, mencionados por Wagner.<sup>69</sup> Así mismo, la reproducibilidad del sistema de CPF, permitió obtener de los extractos de ajo, un patrón de manchas similares y constante entre placas sin embargo, existe mejoría si se adiciona una pequeña cantidad de ácido fórmico y se revela con el reactivo modificado de ninhidrina (contiene iones de cobalto y colidina) y enseguida la aspersion de solución ácida de cloruro de estaño, calentando la placa a 110° C por unos minutos, para la detección mas clara de sulfoxidos, según Michael Keusgen.<sup>73</sup> No obstante, se pueden observar diferentes compuestos presentes en el extracto de ajo, acotados en la división de dos grupos principales: los derivados del aminoácido cisteína, tales como la S-alil cisteína, (desoxialiína) y la S-n-metilcisteína, observados en color violáceo y el segundo grupo, compuestos derivados del sulfoxido de cisteína, como los sulfoxidos de S-metil y S-etil cisteína, el sulfóxido de S-n-

butil cisteína, y el sulfoxido de S-alil cisteína (alina), grupo que se observa de color naranja.<sup>69</sup>

Así mismo, en los cromatogramas, se percibió que las características polares en los extractos se comportan de manera similar, como referencia se hace notar a los compuestos presentes en el extracto de ajo liofilizado, cuyas características polares se manifiestan de manera eficiente por el agua, seguido del metanol, ambos disolventes de mayor polaridad, en contraste con la poca solubilidad de dichos compuestos en di cloro metano y acetato de etilo disolventes de menor polaridad.

Por último, se distinguió que los extractos acuosos frescos presentaron mayor cantidad de compuestos derivados del aminoácido cisteína, (color violáceo) así como los derivados del sulfuro de cisteína (color naranja) y a medida que el tiempo pasó la cantidad y claridad de las manchas se hicieron menos evidentes. Esto se atribuye a la facilidad que estos compuestos tienen de descomponerse al contacto con el aire o en este caso, el agua, según Reuther<sup>32</sup> y Robbers<sup>35</sup>.

## **5.2. Efecto de los extractos *in vitro*.**

La observación y comparación de la susceptibilidad bacteriana ante los diferentes extractos que permitió establecer un criterio de aceptación o rechazo a las siguientes pruebas y con ello la posibilidad de obtener una nueva droga de aplicación animal.

A partir de la concentración de 80 µg por disco y de la sensibilidad bacteriana a las OTC se observó que el EM presentó sensibilidad nula en las cepas de *Aeromonas* y de referencia usadas; evento atribuido a la polaridad elevada de los disolventes y a la capacidad volátil de los compuestos del extracto al contacto con el aire, exponiendo una variante negativa en el espectro de acción bacteriana, resultado también observado por Tirranen *et al.*<sup>74</sup> al estudiar el efecto antimicrobiano de metabolitos volátiles de ajo. Cabe hacer mención que este resultado causó la exclusión del EM del resto del experimento.

Al igual que el EM, el EAL a concentraciones de 80 µg, reflejó poca sensibilidad bacteriana con valores de zonas inhibitorias muy cercanos al sensidisco; debido a la extracción de los compuestos activos durante el proceso de liofilización, fundamento concordante con Krest y Keusgen<sup>75</sup>, quienes describen menor cantidad de metabolitos

secundarios del extracto de ajo en polvo, por tanto menor efecto antimicrobiano e igualmente su exclusión del resto del experimento.

Con el EAF de ajo, se observó sensibilidad en cepas de referencia similar a la provocada por las OTC, bajo las mismas concentraciones (80 µg). Al igual que Monira e Islam <sup>76</sup> quienes, usando el método de difusión en disco, obtuvieron efecto inhibitorio del EAF en cepas de *Aeromonas hydrophila*, *P. aeruginosa* y *E. coli*, así como en cepas de *S. aureus* y *S. faecalis* a concentraciones de 30 µl del extracto por disco. Por otra parte Srinivasan *et al.*, <sup>77</sup> usando la técnica de difusión en pozos y concentraciones de 30 µl / pozo de EAF, lograron mejores efectos inhibitorios de crecimiento de cepas de *P. aeruginosa* y *E. coli*. Así mismo, Singh y Shukla <sup>78</sup>, por difusión en pozos a concentraciones de 20 µl / pozo del EAF, lograron efectos similares que los observados por Srinivasan *et al.*, y resistencia bacteriana de *S. aureus* para el EAF, del mismo modo que la observada en el presente trabajo.

Comparados los tratamientos, se distinguió que para *A. hydrophila* y *A. v. b. sobria* el efecto bactericida de la OTC es igual al del EAF y el EE con  $p > 0.05$ ; para *A. caviae* el efecto del EE es igual al de la OTC con  $p > 0.05$ , así como, para *A. trota* es el mismo efecto entre el EAF y la OTC ( $p > 0.05$ ). En tanto la comparación del efecto entre los extractos y la OTC en la cepa de *A. veronii* tuvo diferencias significativas con una  $p < 0.05$ .

En cuanto a las cepas de referencia, el efecto bactericida en *P. aeruginosa* de EAL, EE y OTC estadísticamente no tiene diferencias significativas ( $p > 0.05$ ); para *S. faecalis* y *S. aureus* el efecto bactericida de OTC y el EE es el mismo con  $p > 0.05$ . En tanto que, no existen diferencias ( $p > 0.05$ ) entre el efecto bactericida del EAF, EE y OTC en *E. coli* (ATCC 25922). Así como, el efecto del EAL y el EE es igual ( $p > 0.05$ ) sobre *E. coli* (K12 14RS19), no obstante, el resultado difiere ( $p < 0.05$ ) entre EAF y OTC y los anteriores para la misma cepa.

Estudios previos han demostrado que a concentraciones de 10 – 30 µg de tetraciclinas existe fuerte actividad contra el 90% de cepas de *A. hydrophila*, según lo mencionan Fass, Barnizan,<sup>79</sup> el equipo de Fainstein,<sup>80</sup> y Overman.<sup>81</sup> Para cepas de *A. sobria* con el método de difusión en disco y concentraciones de tetraciclinas de 30 µg /disco Koehler y Ashdown<sup>82</sup> refieren el 100% de cepas sensibles; al igual que para *A. caviae*, con el mismo método y concentración de tetraciclinas, la sensibilidad fue del 100%.<sup>82</sup>

En México, Castro-Escarpulli y su equipo de colaboradores,<sup>83</sup> refieren que a 30 µg de tetraciclinas / disco, el 100% de las cepas de *A. hydrophila* y el 50% de las cepas de *A. v. b. sobria* aisladas de pescado congelado fueron sensibles.

Por su parte, Motly y colaboradores<sup>84</sup> refieren que el 91% de cepas de *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. v. b. sobria* fueron sensibles a concentraciones  $\leq 1$  µg / mL de tetraciclinas por micro dilución y agregando suplemento catiónico de aminoglicosidos y de timidinfosforilasa en el caldo, lo que indujo a una la CMI de tetraciclinas baja.

Acerca de las concentraciones mínimas inhibitorias de crecimiento en cepas de *Aeromonas* del EAF, en el presente trabajo, tuvo eficacia desde 10 µg /disco en >90% de las cepas de *A. trota* y *A. veronii*; así como a 20 µg /disco, en >90% de las cepas de *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. v. b. sobria*.

Entonces la concentración mínima bactericida o dosis letal 50% (DL<sub>50</sub>) de cepas de *Aeromonas* (20 µg /mL) ante el EAF de ajo fue similar que la concentración mínima inhibitoria de tetraciclinas (30 µg /mL); por tanto la dosis letal 90% (DL<sub>90</sub>) de bacterias sensibles al extracto acuoso fresco de ajo fue de 20 - 40 µg /mL.

Respecto a la comparación entre tratamientos, se encontró que a 5 µg el efecto de los EAF y EE estadísticamente no tienen diferencias ( $p > 0.05$ ) con el efecto de las OTC para *A. hydrophila* ATCC 49140, a diferencia del EAL ( $p < 0.05$ ). No obstante, acorde con los rangos de sensibilidad a las tetraciclinas establecidos por la NCCLS (cuadro 5), la cepa de *A. hydrophila* fue sensible a las OTC y el EE y resistente a los EAF y EAL. Para las cepas de *A. caviae* (ATCC 88784), estadísticamente el efecto entre EE y OTC no es diferente ( $p > 0.05$ ) y por rango ambos provocan sensibilidad bacteriana. La sensibilidad moderada en *A. v. b. sobria* (ATCC 102831) se mostró estadísticamente sin diferencias ( $p < 0.05$ ) ante las OTC, EAF y EE, sin embargo, categóricamente fue sensible al EE y OTC y resistente ante el EAF y EAL. Se apreció franca resistencia ( $p < 0.05$ ) de *A. veronii* (ATCC 98632) y *A. trota* (ATCC 102811) ante los EAL, EAF y EE.

De acuerdo a los rangos categóricos de sensibilidad *in vitro*, establecidos por el NCCLS, a 40 µg /disco de EAF, se observó que  $\geq 90\%$  de cepas de *Aeromonas hydrophila* y 100% de cepas de *A. caviae*, *A. trota*, *A. veronii* y *A. v. b. sobria* fueron sensibles; situando al extracto acuoso fresco de ajo como un agente terapéutico efectivo contra *Aeromonas*.

De la comparación estadística y categórica entre tratamientos, la cepa de *P. aeruginosa* (ATCC 27853) fue resistente ( $p > 0.05$ ) a todos los tratamientos. La cepa *S. faecalis* (ATCC 29212) mostró halos de sensibilidad ante el EAF y OTC ( $p > 0.05$ ) y resistente al extracto liofilizado y al Biodegerm® y las OTC. Para la *E. coli* (ATCC 25922) el EAL no genera reacción bactericida, no así los extractos acuoso fresco y estabilizados, a los que dicha cepa es moderadamente sensible. Así mismo, la resistencia hacia el EAL, EE y al EAF de *E. coli* (K12 14RS19).

Basado en el tiempo, el efecto bactericida en el presente trabajo que se requirió para matar al 99.9% de las cepas de *Aeromonas*, se encontró al cabo de 1 hora el efecto del EAF bajo la relación 3:1 (inóculo : EAF), a dosis de 20 µg /disco mantiene >90% de muerte de *Aeromonas*, contrastado con el conteo de UFC /mL constante del control (PBS). La aseveración de que el EAF de ajo es bactericida, es apoyada por Kumar y Berwal<sup>85</sup>, quienes usando la técnica turbidimétrica, refieren mortalidad bacteriana del 80% para *S. aureus* expuesto en una suspensión del 5% de EAF y más del 90% de mortandad bacteriana en 10% de EAF suspendido para *E. coli*.

Por otra parte y dado que su efectividad sobre las cepas bacterianas fue amplia y no se encontraron vestigios de metabolitos de coloración similar a la observada en los extractos de ajo en los cromatogramas, se atribuye el efecto del Extracto Estabilizado a los vehículos y la mezcla de cítricos con aleínas y filiferinas, así como otros compuestos que pudiera contener. Al respecto, Royo *et al.*<sup>86</sup>, comprobaron la actividad antibacteriana de un extracto estabilizado llamado Biocitro® en *A. hydrophila*, a diferencia de la CMI del EE (Biodegerm®) fue mayor que la mencionada por Royo y su equipo de trabajo, así como la diferencia de especies y ambiente acuático al cual fueron sometidos los organismos.

### **5.3. Efecto de los extractos *in vivo*.**

Además de simular condiciones de manejo habituales en sistemas intensivos, durante esta etapa se buscó controlar factores ambientales que influyeran en el resultado del experimento.

Al final, se realizó un análisis comparativo de las medias de los registros diarios de los parámetros del agua, en los que no se encontraron diferencias estadísticamente

significativas ( $p > 0.05$ ) entre tratamientos. Sin embargo, al análisis entre bioensayos, se observó ligera variación para los parámetros de temperatura en el tercer bioensayo y para pH en el segundo ( $p < 0.05$ ). Asumida la primera, por una falla eléctrica temporal durante el desarrollo de ese bioensayo, así como el exceso de alimento suministrado durante el segundo bioensayo.

A pesar de las diferencias entre bioensayos, los tres parámetros evaluados, se mantuvieron estables durante el experimento, esto es que los valores promedio de temperatura de todos los tratamientos caen dentro de los rangos normales (24–29° C), los valores de pH se encuentran en los límites máximos normales (6.5-7.5) y para los valores de oxígeno disuelto establecidos como normales para tilapias son de 3-5 mg / L que, comparados con los registrados muestran ligera disminución en el promedio general del segundo bioensayo, pero sin variaciones extremas. Valores que según Zohar y Rappaport<sup>87</sup> si se rebasan, en el ámbito intensivo pueden causar aumento en la tasa de mortalidad. Entonces la calidad del agua fue adecuada y no influyó las tasas de mortalidad finales en peces.

Para Shoemaker *et al.*,<sup>88</sup> la infección mediante inmersión o cohabitación, mostraron no ser tan diferentes para causar mortalidades del 32 %; también refieren que a densidades de 11.2 g de pez por litro de agua, existe mayor porcentaje de mortalidad, contrario a las tasas de mortalidad (7.8%) de organismos infectados por contacto, sometidos a control de manejo y sin tratamiento alguno, grupo control positivo (I) del presente trabajo y que de acuerdo a Shoemaker *et al.*<sup>88</sup> con 3.57 g de pez / litro de agua manejadas en este estudio, se obtuvo un 32% de densidad media mortal. Esto significó mayores tasas de mortalidad de organismos control de manejo (M) que de organismos control positivo (I), es decir, dado que el estrés es uno de los factores desencadenantes de la septicemia hemorrágica y otros desórdenes fisiológicos<sup>89</sup> se encuentra que el manejo practicado a los organismos en el presente estudio fue efectivo para provocar enfermedad y muerte de peces paralelo a la acción de las *A. hydrophila*.

De acuerdo al volumen de distribución de fármacos en el pez (2.57 a 2.90 L / kg de peso corporal) y el rango de eliminación (266.3 a 326.9 horas) de la OTC,<sup>90</sup> y su efectivo espectro bactericida, la OTC es un antibiótico ampliamente usado en el tratamiento de la septicemia hemorrágica,<sup>91</sup> que controla la enfermedad y mantiene tasas de mortalidad

baja en acuicultura; por lo tanto el uso como tratamiento de grupo control negativo (O) en el presente estudio es concordante, dadas las bajas tasas de mortalidad registradas.

Al respecto de la mortalidad en organismos tratados, el grupo B, sufrió un 96%, de mortalidad, resultado de la toxicidad del Biodegerm® administrado por inmersión a dosis de 200 ppm ( $\mu\text{l} / \text{L}$ ), a diferencia de lo referido por Royo *et al.*<sup>86</sup> quienes informan una mortalidad del 10% en truchas infectadas con *A. hydrophila*, inoculadas intra peritoneal y tratadas con un producto llamado Biocitro® similar en contenido y concepto al EE (Biodegerm®) a dosis de 150 ppm en el alimento.

Eventos de toxicidad de los compuestos del ajo han sido descritos por Cavallito y Hays,<sup>30</sup> que a dosis de 60 mg / kg de peso vivo (PV) vía intravenosa y 120 mg / Kg PV subcutáneo observaron una  $DL_{50}$  en ratones inoculados con solución acuosa de allicina; contrario al efecto de sus precursores (S-Allylcysteina), que inoculados en ratones y ratas a concentraciones 2100 – 15000 mg / kg PV oral e intraperitoneal, Kodera *et al.*<sup>29</sup> observaron toxicidad aguda  $DL_{50}$  a dosis  $\geq 2600$  mg/ kg PV y toxicidad crónica baja a 250, 500, 1000 y 2000 mg/kg vía oral cada 24 hr al cabo de un mes. Hasta ahora no se han encontrado reportes que contemplen el efecto tóxico de los compuestos del EAF de ajo en organismos acuáticos, sin embargo, cabe mencionar la posibilidad de dicho efecto en peces sometidos a estrés y altas densidades en acuarios, como se observó en el grupo T, que a dosis de 2800  $\mu\text{L} / \text{L}$  de agua inmersos en el medio, registraron tasas de mortalidad mayores que los grupos control I, M y O. Ante ello se piensa que el EAF provoca ligera toxicidad hacia los organismos, lo que induce al desarrollo de estudios posteriores al respecto.

En lo que respecta al Extracto Acuoso de Ajo, podría adquirir la categoría de coadyuvante en la terapéutica práctica, si bien los porcentajes de mortalidad no son mejores que los de las OTC, la muerte por toxicidad a la concentración usada en éste trabajo no es tan elevada que la observada con el EE. Entonces el efecto *in vitro* ha tenido éxito en este trabajo, pero a nivel *in vivo*, el EAF mostró menor efecto al igual que los trabajos de Colorni *et al.*<sup>92</sup> y Mogney<sup>93</sup> contrario a la opinión de Villamar<sup>94</sup> que menciona haber usado al ajo en sistemas acuícola en el Ecuador, no obstante su diferencia con el presente trabajo, radica en el medio, dosis, vía de suministro y especies tratadas.

Por otra parte, la absorción rápida y fácil de la alicina en el tracto gastrointestinal del EAF de ajo, su buena distribución hacia plasma, hígado y riñón en animales descrito por Nagae *et al.*,<sup>95</sup> así como, la sinergia con antibióticos expuesta por Davis *et al.*<sup>96</sup> y con cítricos mostrada por Villamar<sup>94</sup> y Royo *et al.*,<sup>86</sup> muestran a la alicina a través del EAF de ajo como un posible coadyuvante en el tratamiento de peces, suministrado vía oral, como suplemento alimenticio.

Respecto a la incidencia infecciosa, se observó que las proporciones de bacterias reaisladas positivas a la citocromo C oxidasa pertenecen a los géneros *Aeromonas* o *Pseudomonas*, lo que indica contaminación de la laceración por el medio acuático y proliferación bacteriana.

La identificación de *A. hydrophila* por aglutinación en placa, a pesar de los altos grados de titulación que las cepas de *A. hydrophila* generan, de acuerdo a la experiencia de Ruangpan *et al.*,<sup>97</sup> fue 40% de las cepas aisladas del grupo I, es decir 4 de 10 cepas oxidasa positivas aisladas de la zona lacerada. Dado que en este la infección no fu tratada, se sugiere efecto bactericida selectivo del EAF en cepas de *Aeromonas hydrophila*. A este punto, cabe señalar que la técnica indirecta de inmuno fluorescencia a anticuerpos, usando anti-cuerpos poli-clonales contra las especies de bacterias a confirmar, puede ser una alternativa viable para comprobar incidencia infecciosa con mas precisión como lo mencionan Soltani *et al.*<sup>98</sup>.

En virtud que las diferencias en la manifestación del grado de virulencia dentro de las bacterias, están relacionadas con el ambiente al cual son sometidas según Angka *et al.*<sup>99</sup>, relacionadas con la entrada y concentración de inóculo necesaria para reproducir la enfermedad en el huesped, según Evans *et al.*,<sup>100</sup> relacionadas con productos propios de la bacteria, como las proteínas externas según Chen *et al.*<sup>101</sup>, las de membrana externa, según Hädige *et al.*<sup>102</sup>, Zakasaki y Shimada<sup>103</sup> así como las flagelares Kirov;<sup>104</sup> inducen a proponer se desarrollen pruebas posteriores que revelen el mecanismo de acción *in vitro* del extracto acuoso fresco de ajo en cepas de *A. hydrophila*, basados en estos factores de virulencia y la interacción de la alicina en los tejidos celulares, debido a que Focke *et al.*<sup>105</sup> mencionan que la alicina actúa inhibiendo la formación de ácidos grasos y lípidos.

De acuerdo a los hallazgos histopatológicos, la producción de moco de las células caliciformes, señalan actividad inhibitoria de colonización bacteriana en organismos de los

grupos terapia y control; la congestión sanguínea en algunas lesiones así como, la elevada frecuencia de linfocitos son características de actividad migratoria celular, en los procesos de inflamación y la respuesta humoral no específica<sup>106</sup>; datos concordantes con Sobhana *et al.*<sup>107</sup> quienes refieren necrosis y hemorragias en tejido muscular una hora después del inóculo de *A. hydrophila* vía intramuscular; en las 12 horas después, observaron extravasación de neutrofilos seguida de necrosis generalizada, en todos los casos control sin tratamiento, no obstante, Sobhana *et al.*<sup>107</sup> describen que a las 24 horas de la inoculación, comienza a desarrollarse necrosis muscular, a diferencia del presente trabajo, ese hallazgo se observó después de 3 días de la inoculación como signo característico de septicemia hemorrágica. La presencia de melanomacrófagos y las tinciones fuertes de células de Malphigian, revelan clara actividad fagocítica y finalmente la apreciación de vasos de neoformación y tejido conjuntivo, son indicativos de reparación tisular, que en el presente trabajo comenzaron a observarse a los 3 días de tratamiento, mencionado de manera diferente por Sobhana *et al.*<sup>107</sup> quienes a los 6 días post infección observaron la regeneración de fibras musculares y los procesos de reparación. Es preciso señalar que ellos trabajaron con suplemento de vitamina C en el alimento y la zona de infección se mantuvo cerrada. Lo que conduce a suponer que los efectos del EAF, y del medio están íntimamente ligados en la estimulación a las respuestas de los mecanismos de defensa más que a efectos bactericidas directos, datos apoyados con lo reportado por Colorni *et al.*<sup>92</sup> quienes después de suministrar EAF de ajo a lobinas (*Dicentrarchus labrax*) infectadas, por histopatología observaron lesiones y hallazgos de infección por *Mycobacterium marinum* solamente.

Por último, cabe mencionar que en el presente trabajo no se observaron hallazgos en otros órganos de ningún organismo de ninguno de los grupo, atribuido al periodo corto de tiempo en que los organismos permanecieron en experimentación; a diferencia de Afifi *et al.*<sup>108</sup> quienes señalan hallazgos en ojo, hepatopáncreas y bazo, en el diagnóstico de la septicemia hemorrágica en de peces sometidos a periodos de temperatura elevada (40–50° C) en granjas productoras de tilapia en Arabia Saudita.

## 6. CONCLUSIONES

### 6.1. Conclusiones.

- ← El extracto macerado es reproducible para grandes cantidades, no obstante no tiene efecto bactericida dada la volatilidad de los compuestos del ajo y disolventes con los que son extraídos.
- ← El extracto acuoso liofilizado pierde actividad durante el proceso de extracción dada la volatilidad de los compuestos del ajo.
- ← El protocolo de extracción es reproducible y los extractos acuosos frescos de ajo muestran características físicas y químicas constantes. La reacción de descomposición de los compuestos del ajo en el extracto acuoso es en menor grado y en solución / suspensión el EAF muestra mejores efectos bactericidas *in vitro*.
- ← De acuerdo a los rangos categóricos de sensibilidad *in vitro*, establecidos por el NCCLS, a 20 µg /disco de EAF, se observó que  $\geq 40\%$  de cepas de *Aeromonas hydrophila* y  $\geq 50\%$  de cepas de *A. caviae*, *A. trola*, *A. veronii* y *A. v. b. sobria* fueron sensibles. Situando al extracto acuoso fresco de ajo como un agente terapéutico con fuerte actividad bactericida contra *Aeromonas*.
- ← La concentración mínima bactericida o DL<sub>50</sub> del EAF es similar que la concentración mínima inhibitoria de antibióticos (30 µg /mL), a lo que la DL<sub>90</sub> del extracto acuoso fresco de ajo es de 20 - 40 µg /mL. Por lo tanto, las cepas de *Aeromona hydrophila* son sensibles al extracto acuoso fresco de ajo a 30 µg /mL, *in vitro*.
- ← Basado en el tiempo, el efecto bactericida en el presente trabajo que se requirió para matar al 99.9% de las cepas de *Aeromonas*, se encontró al cabo de 1 hora, efecto del EAF bajo la relación 3:1 (inóculo : EAF) a concentración de 20 µg / mL de EAF e inóculo bacteriano  $1.5 \times 10^8$  UFC / mL, mantiene  $>90\%$  de muerte de *Aeromonas*, El extracto acuoso fresco de ajo mata al 99.9% de cepas de *Aeromona hydrophila* en un periodo de treinta a sesenta minutos *in vitro*.
- ← El extracto acuoso de ajo inhibe el crecimiento de *A. hydrophila* en peces infectados, a dosis de 200 ppm, administrado en el agua cada 24 horas por 3 días.

- ← Por otra parte y dado que su efectividad sobre las cepas bacterianas y al no encontrar vestigios de metabolitos de coloración similar a la observada en los extractos de ajo en los cromatogramas, se atribuye el efecto del extracto estabilizado a los vehículos y la mezcla de cítricos con aleínas y filiferinas, así como otros compuestos que pudiera contener el Biodegerm® y a dosis de 200 ppm, administrado en el agua cada 24 horas por 3 días es 90% letal para peces.
- ← El manejo practicado a los organismos en el presente estudio fue efectivo para provocar enfermedad y muerte de peces paralelo a la acción de las *A. hydrophila*.
- ← El extracto acuoso fresco de ajo contribuye a la regeneración tisular, dada la respuesta inmune que provoca por irritación constante en piel y músculo con ligera toxicidad crónica ( $p < 0.05$ ) en peces sometidos a manejo, altas densidades en acuarios y 200 ppm de EAF inmerso en el medio, durante 3 días.

## **6.2. Perspectivas.**

- Dada la dificultad para cuantificar los metabolitos secundarios del ajo, se propone purificar la alicina y estabilizarla en sales o vehículos estables e inoocuos para peces.
- Evaluar los mecanismos de acción *in vitro* del extracto acuoso fresco de ajo y / la alicina en cepas de *Aeromonas*, basados en los factores de virulencia de la cepa.
- Continuar la evaluación de la eficacia de los extractos acuosos de ajo comparativamente con otros desinfectantes.
- Realizar estudios farmacológicos para evaluar la farmacocinética, farmacodinamia, espectro de acción, efectos secundarios y posología del extracto acuoso de ajo o alicina.

## 7. REFERENCIAS

- 1 FAO. World aquaculture production of fish, crustaceans, mollusks, etc., by principal producers in 2001. FAO Publishing [serial online] 2003 June-July [cited 2003 July 14]; Available from: URL:<http://www.fao.org/docrep/field/003/AC596SOO.htm#TOC>.
- 2 Garduño LM. Comparación de parámetros reproductivos, de crecimiento, fenotípicos y económicos de tilapia roja. Gaceta Regional, Sistemas de Investigación Regionales 1999; 2:5-6.
- 3 Granados AI, Garduño LM y Muñoz CG. Comparación de crecimiento y evaluación económica entre el genotipo de tilapia gris (*Oreochromis niloticus*) y el híbrido rojo (*Oreochromis mossambicus* x *O. niloticus*). Disponible en: <http://www.ecologia.edu.mx/sigolfo/pagina-n2.htm>.
- 4 Norma Oficial Mexicana NOM-011-PESC-1993, para regular la aplicación de cuarentenas, prevención y dispersión de enfermedades certificables y notificables, en la importación de organismos acuáticos vivos, destinados a la acuicultura y ornato en los Estados Unidos Mexicanos.
- 5 Norma Oficial Mexicana NOM-EM-05-PESC-2002. Requisitos y medidas para prevenir y controlar la dispersión de enfermedades de alto impacto y para el uso y aplicación de antibióticos en la camaronicultura nacional.
- 6 Austin B, Altwegg M, Gosling PJ, Joseph SW. The genus *Aeromonas*. New York: John Wiley & Sons, 1996.
- 7 Prescott LM, Harley JP y Klein DA. Microbiología. 4ª Ed. España : McGraw Hill – Interamericana, 1999.
- 8 Angka SL, Lam TJ and Sin YM. Some virulence characteristics of *Aeromonas hydrophila* in walking catfish (*Clarias gariepinus*). Aquaculture 1995; 130: 103-112.
- 9 Zhang YL, Ong CT and Leung KY. Molecular analysis of genetic differences between virulent and avirulent strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish. Microbiology 2000; 146: 999-1009.
- 10 Sharnoby REL. Variation analysis of protein densitometry profiles of *Aeromonas hydrophila* isolated from *Oreochromis niloticus* fish caught at Cairo, Gharbia, Manzala and Edquo areas. Vet Med J Giza 1999; 3 : 415 – 420.
- 11 Arteaga GRI. Serotipificación de cepas de *Aeromonas* spp aisladas en México (tesis de licenciatura). México (DF) México: Instituto Politécnico Nacional, 2002.
- 12 Asha A, Nayak DK, Shankar KM and Mohan CV. Antigen expresión in biofilm cells of *Aeromonas hydrophila* employed in oral vaccination of fish. Fish Shellfish Immunol 2004; 16 : 429 – 436.
- 13 Castro EG. Determinación de algunos factores de virulencia de cepas de *Aeromonas* spp aisladas de muestras clínicas y de agua (tesis de maestría). México (DF) México: Instituto Politécnico Nacional, 1998.
- 14 Popvić TN, Teskeredžić E, Strunjak-Perović I, Čož-Rakovac R. *Aeromonas hydrophila* isolated from wild freshwater fish in Croatia. Vet Res Commun 2000; 24: 371-377.
- 15 Almeida LJ, Da Silva EJ, Freitas YM. Microorganisms from some tropical fish diseases. J Fish Res Board Can 1968, 1: 197-201.
- 16 Negrete RP y Romero JJ. Presencia de bacterias patógenas en peces de ornato. Hidrobiológica 1999; 2: 85-94.

- 
- 17 Stickney RR. Enciclopedia of aquaculture. U.S.A: John Wiley & Sons, 2000.
  - 18 Treves-Brown KM. Applied fish pharmacology. Aquaculture series 3. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000.
  - 19 FDA. Aquaculture drugs. In fish and fishery products hazards and controls guide. 2nd ed. Washington, D.C. : FDA, 1998 :115-132.
  - 20 Bell TA. Antimicrobial susceptibility data and new animal drug approval in the United States: a historical overview. Aquaculture 2001; 196: 245-251.
  - 21 Ostrander GK, editor. The laboratory fish. Great Britain : Academic Press, 2000.
  - 22 Camus AC, Durborow RM, Hemstreet WG, Thune RL and Hawke JP. Aeromonas bacterial infections-Motile aeromonad septicemia. SRAC 1998; 478.
  - 23 Tendencia EA, De la Peña L. Level and percentage recovery of resistance to oxytetracycline and oxolinic acid of bacteria from shrimp ponds. Aquaculture 2002; 213: 1-13.
  - 24 Dehai X, Wilmer AR. Oxytetracycline residue in striped bass muscle. J Aqua Anim Health 1994, 6: 349-354.
  - 25 Sumner J. The natural history of medicinal plants. Portland, Oregon : Timber Press, 2000.
  - 26 Murphy CM. Plants products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev 1999, 4: 564-582.
  - 27 Block E. The chemistry of garlic and onions. Sci Am 1985, 3: 114-119.
  - 28 Reuter HD, Sendl A. *Allium sativum* and *Allium ursinum*. In : Wagner & Norman RF editors. Chemistry, Pharmacology and medicinal applications. Sn. Diego, California : Academic Press, 1994: 56-113.
  - 29 Kodera Y, Suzuki A, Imada O, Kasuga S, Sumioka I, Kanezawa A, Taru N, Fujikawa M, Nagae S, Masamoto K, Maeshige K, Ono K. Physical, chemical and biological properties of s-allylcysteine, an amino acid derived from garlic. J Agric Food Chem 2002, 50: 622-632.
  - 30 Cavallito CHJ, Hays BJ. Allicin, The antibacterial principle of *Allium sativum*. I. Isolation, physical properties and antibacterial action. J Am Chem Soc 1944; 66: 1950-1951.
  - 31 Cavallito CHJ, Buck JS, Suter CM. Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. II. determination of the chemical structure. J Am Chem Soc 1944; 66: 1952-1954.
  - 32 Cavallito CHJ,. Allicin, The antibacterial principle of *Allium sativum*. III. Its precursor and "essential oil of garlic". J Am Chem Soc 1945; 67: 1032-1033.
  - 33 Sun KY, Pike LM. Determination of flavor precursor compound S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides by an HPLC method and their distribution in *Allium* species. Sci Hortic 1998, 75: 1-10.
  - 34 Arnault I, Cristides JP, Mandon N, Haffner T, Kahane R, Auger J. High-performance ion-pair chromatography method for simultaneous analysis of alliin, deoxiin, allicin and dipeptide precursors in garlic products using multiple mass spectrometry and UV detection. J Chromatogr 2003, 991: 69-75.
  - 35 Perez HA, De la Rosa M and Apitz R. *In vivo* activity of ajoene against rodent malaria. Antimicrob Agents Chemother 1994; 2:337-339.
  - 36 Baluchnejadmojarad T, Roghant M, Homayounfar H, Hossein M. Beneficial effect of aqueous garlic extract on the vascular reactivity of streptozotocin-diabetic rats. J Ethnopharmacol 2003, 85 : 139-144.

- 
- 37 Helen A, Rajasree CR, Krishnakumar K, Phil M, Augusti KT, Vijayammal PL. Antioxidant role of oils isolated from garlic (*Allium sativum* Linn) and onion (*Allium cepa* Linn) on nicotine-induced lipid peroxidation. *Vet Hum Toxicol* 1999, 41 (5): 316-319.
  - 38 Salman H, Bergman M, Bessler H, Punskey I, Djaldetti M. Effect of garlic derivative (alliin) on peripheral blood cell immune responses. *I J Immunopharmacol* 1999, 21: 589-597.
  - 39 Kang NS, Moon EY, Cho CG, Pyo S. Immunomodulating effect of garlic component, allicina, on murine peritoneal macrophages. *Nutrit Res* 2001, 21: 617-626.
  - 40 Weisberger A, Pensky J. Tumor-inhibiting effects derived from an active principle of garlic (*Allium sativum*). *Science* 1957, 126: 1112-1114.
  - 41 Ruomei-Qi and Zhengang W. Pharmacological effects of garlic extract. *Trends Pharmacol Sci* 2003 24 (2):62-63.
  - 42 Tansey MR, Appleton JA. Inhibition of fungal growth by garlic extract. *Mycologia* 1975; 67:409-413.
  - 43 Yoshida S, *et al.* Antifungal activity of ajoene derived from garlic. *Appl Environ Microbiol* 1987; 53 (3): 615-617.
  - 44 Karunyal JS, Andrews B, Jebashree S. In vitro evaluation of the antifungal activity of *Allium sativum* bulb extract against *Trichophyton rubrum*, a human skin pathogen. *World J Microbiol Biotechnol* 2000, 16: 617-620.
  - 45 Barone FE, Tansey MR. Isolation, purification, identification, synthesis and kinetics of activity of the anticandidial component of *Allium sativum* and a hypothesis for its mode of action. *Mycologia* 1977; 69: 793-825.
  - 46 Mirelman D. Inhibition of growth of *Entamoeba histolytica* by Allicin, the active principle of garlic extract (*Allium sativum*). *J Infect Dis* 1987; 1: 243-244.
  - 47 Ankri S, Miron T, Rabinkov A, Wilchek M, Mirelman D. Allicin from garlic strongly inhibits cysteine proteinases and cytopathic effects of *Entamoeba histolytica*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:2286-2287.
  - 48 De la Vega AM, Pérez HN, Cortéz PT, Ortega PMG, Arguello GR. *In vitro* susceptibility of the parasite *Giardia duodenalis* to components of garlic (*Allium sativum*). *Rev Lat Química* 2001; 29 (suppl. esp.): 78.
  - 49 Weber, N D, *et. al.* *In vitro* virucidal effects of *Allium sativum* (garlic) extract and compounds. *Planta Med* 1992; 58: 417-423.
  - 50 Harris JC, Cottrell SP, Lloyd D. Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Appl Microbiol Biotechnol* 2001; 57: 282-286.
  - 51 Feldberg R, *et al.* *In vitro* mechanism of inhibition of bacterial cell growth by allicin. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 12:1763-1768.
  - 52 Naganawa R, *et. al.* Inhibition of microbial growth by ajoene, a sulfur-containing compound derived from garlic. *Appl Environ Microbiol* 1996; 11: 4238-4242.
  - 53 Sharma SR, *et al.* Evaluation of crude extract of garlic in dermatophytosis of calves. *Int J Anim Sci* 1994; 9: 239-240.
  - 54 Sréter T, Széll Z, Varga I. Attempted chemoprophylaxis of cryptosporidiosis in chickens, using diclazuril, toltrazuril or garlic extract. *J Parasitol* 1999; 85 (5): 989-991.

- 
- 55 Singh KV, Shukla NP. Activity on multiple resistant bacteria of garlic (*Allium sativum*) extract. *Fitoterapia* 1984; 5 : 313-315.
- 56 Ahsan M, Islam SN. Garlic: a broad spectrum antibacterial agent effective against common pathogenic bacteria. *Fitoterapia* 1996; 4 : 374-377.
- 57 Cellini L, Di Campli ED, Masulli M, Di Bartolomeo and Allocati N. Inhibition of *Helicobacter pylori* by garlic extract (*Allium sativum*). *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1996; 13: 273-277.
- 58 Wagner H, *et al.* Plant drug analysis, a thin layer chromatography atlas. Berlin Heidelberg, Germany : Springer-Verlag, 1984.
- 59 NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twelfth informational supplement. Pennsylvania, USA : NCCLS, 2002.
- 60 Alderman DJ and Smith P. Development of draft protocols of standard reference methods for antimicrobial agents susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases. *Aquaculture* 2001; 196: 211-243.
- 61 Elliot EL, *et al.* Bacteriological analytical manual (Food and Drug Administration), 8th Ed. Arlington, VA: AOAC International, 1995.
- 62 Senen CM, Auró AA, De Buen AN. Lesiones histopatológicas producidas en la tilapia (*Oreochromis* sp) por el confinamiento experimental en acuario. *Vet Méx* 1996; 2 : 143-148.
- 63 Dawson-Saunders B, Trapp RG. Bioestadística médica 2a Edición México D.F.: El Manual Moderno, 1997.
- 64 Collins R. Acuicultura para Veterinarios, Brown L. Zaragoza España : Acribia, 2000.
- 65 Sakasaki R, Shimada T. O-serogrouping scheme for mesophilic *Aeromonas* strains. *Jpn J Med Sci Biol* 1984; 37: 247-255.
- 66 Sakazaki R, Donovan TJ. Serology and epidemiology of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. In: *Methods in microbiology*, Vol. 16. London : Academi Press, 1984.
- 67 Reimschuessel R, *et al.* Necropsy examination of fish. *Vet Clin North Am* 1988; 2: 427 – 433.
- 68 Ferguson HW. Sistemic pathology of fish. a text an atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts. USA : Iowa State University Press, 1989.
- 69 Milton JS. Estadística para biología y ciencias de la salud. 3a. Ed. España: McGraw-Hill Interamericana, 2001.
- 70 Fleiss JL. Statistical methods for rates and proportions. 2d. Ed. Canada: John Wiley & Sons, 1981.

- 
- 71 Caporaso N, Smith SM and Eng RHK. Antifungal activity in human urine and serum after ingestion of garlic (*Allium sativum*). *Antimicrob Agents Chemother* 1983; 5: 700-702.
- 72 Monira A, Chowdhury AKA, Islam SN and Ahmed ZU. Garlic extract and allicin: broad spectrum antibacterial agents effective against multiple drug resistant strains of *Shigella dysenteriae* type 1 and *Shigella flexneri*, enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio Cholerae*. *Phytother Res* 1996; 10: 329-331.
- 73 Keusgen M. TLC Analysis of *Allium sativum* constituents. *Planta Med* 1997; 63:93-94.
- 74 Tirranen LS, Borodina EV, Ushakova SA, Ye Rygalov V and Gitelson JI. Effect of volatile metabolites of dill, radish and garlic on growth of bacteria. *Act Astronaut* 2001; 2 : 105 – 108.
- 75 Krest I and Keusgen M. Quality of herbal remedies from *Allium sativum*: differences between alliinase from garlic powder and fresh garlic. *Planta Med* 1999; 65: 139-143.
- 76 Monira A and Islam SN. Garlic: A broad spectrum antibacterial agent effective against common pathogenic bacteria. *Fitoterapia* 1996; 4 : 374-376.
- 77 Srinivasan D, Sangeetha N, Suresh T and Perumalsamy LP. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *J Ethnopharmacol* 2001; 74 : 217 – 220.
- 78 Singh KV y Shukla NP. Activity on multiple resistant bacteria of garlic (*Allium sativum*) extract. *Fitoterapia* 1984; 5 : 313 – 315.
- 79 Fass RJ, Barnishan J. *In vitro* susceptibilities of *Aeromonas hydrophila* to 32 antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1981; 2 : 357 – 358.
- 80 Fainstein V, Weaver S and Bodey GP. *In vitro* susceptibilities of *Aeromonas hydrophila* against new antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; 3 : 513 – 514.
- 81 Overman T. Antimicrobial susceptibility of *Aeromonas hydrophila*. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; 4 : 612 –614.
- 82 Koehler JM and Ashdown LR. *In vitro* susceptibilities of tropical strains of *Aeromonas* species from Queensland, Australia, to 22 antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37 : 905 – 907.
- 83 Castro-Escarpulli G, Figueras MJ, Aguilera-Arreola G, Soler L, Fernandez-Rendón E, Aparicio GO, Guarro J y Chacón MR. Characterization of *Aeromonas* spp. Isolated from frozen fish intended for human consumption in México. *Int J Food Microbiol* 2003; 84 : 41 – 49.
- 84 Motyl MR, McKinley G and Janda MJ. *In vitro* susceptibilities of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria* and *Aeromonas caviae* to 22 antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 1 : 151 – 153.
- 85 Kumar M and Berwal JS. Sensitivity of food pathogens to garlic (*Allium sativum*). *J Appl Microbiol* 1998; 84: 213 - 215.
- 86 Royo F, De Blas I, Ortega C y Muzquiz JL. Uso de Biocítrico para el control de patógenos bacterianos que afectan a la trucha arcoiris *Onchorinchus mikiss*. Memorias del VI EINCIP 2001. Medellín, Colombia, 8 – 9 noviembre del 2001. Disponible en: [http://cuco.unizar.es/infecapi/publicaciones/listar\\_pubs.asp?autor&ce=12](http://cuco.unizar.es/infecapi/publicaciones/listar_pubs.asp?autor&ce=12)
- 87 Zohar G, Pappaport U and Sarig S. Intensive culture of tilapia in concrete tanks., *Bamidgeh* 1985; 4 : 103 – 111.

- 
- 88 Shoemaker CA, Evans JJ and Klesius PH. Density and dose: factors affecting mortality of *Streptococcus iniae* infected tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 2000; 188 : 229 – 235.
- 89 Schreck CB, Contreras-Sánchez W and Fitzpatrick MS. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. Aquaculture 2001; 197 : 3 – 24.
- 90 Haug T and Arnt PH. Pharmacokinetics of oxytetracycline in arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) in freshwater at low temperature. Aquaculture, 2000; 186 : 175 –191.
- 91 Francis-Floyd R. *Aeromonas* infections. Fisheries and Aquatic Sciences Department (FA14) [serial online] June 1991 [cited 2002 July]; Available from: URL:<http://edis.ifas.ufl.edu>.
- 92 Colorni A, Avtalion R, Knibb W, Berger E, Colorni B and Timan B. Histopathology of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) experimentally infected with *Mycobacterium marinum* and treated with streptomycin and garlic (*Allium sativum*) extract. Aquaculture, 1998;160:1–17.
- 93 Mogney AFA. *In vitro* and *in vivo* characterization of some pathogenic microorganisms isolated from broilers in Behera province with special reference to the efficacy of *Allium sativum* "garlic". Assiut Vet Med J 1998; 78 : 334 – 344.
- 94 Villamar OCA. Acuicultura orgánica-ecológica: Aplicación de productos naturales en sustitución de químicos en los procesos de cría de camarones en cautiverio. Aquatic, 2000; 10: 1-9.
- 95 Nagae S, Ushijima M, Hatono S, Imai J, Kasuga S, Matsuura H, Itakura Y and Higashi Y. Pharmacokinetics of the garlic compound S-Allylcysteine. Planta Med 1994; 60 : 214 – 217.
- 96 Davis LE, Shen J and Royer RE. *In vitro* synergism of concentrated *Allium sativum* extract and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. Planta Med 1994; 60 : 546 – 549.
- 97 Ruangpan L, Kitao T and Yoshida. Protective efficacy of *Aeromonas hydrophila* vaccines in Nile tilapia. Vet Immunol Immunopath 1986; 12 : 345 – 350.
- 98 Soltani M and Khorasgani MR. Evaluation of indirect immunofluorescent antibody technique for detection of *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas hydrophila* infections in cultured and pawn. J Fac Vet Med Univ Theran. 2000.
- 99 Angka SL, Lam TJ and Sin YM. Some virulence characteristics of *Aeromonas hydrophila* in walking catfish (*Clarias gariepinus*). Aquaculture 1995; 2-3 : 103-112.
- 100 Evans JJ, Shoemaker CA and Klesius PH. Experimental *Streptococcus iniae* infección of hybrid striped bass (*Morone chrysops* X *Morone saxatilis*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) by nares inoculation. Aquaculture, 2000; 189 : 197 – 201.
- 101 Chen SC, Adams A and Richards RH. Extracellular products from *Mycobacterium* spp. In fish. J Fish Dis 1997; 20 : 19 – 25.
- 102 Hädge D, Lachmann I, Wagner U and Drössler K. Characterization of core-oligosaccharide- and O-polysaccharide-specific monoclonal antibodies against *Aeromonas salmonicida* LPS binding to typical and atypical *Aeromonas salmonicida* isolated. Aquaculture 1997; 157 : 157 – 171.
- 103 Sakazaki R and Shimada T. O- serogrouping scheme for mesophilic *Aeromonas* strains. Jpn J Med Sci Biol 1984; 37 : 247 – 255.

- 
- 104 Kirov MS. Bacteria that express lateral flagella enable dissection of the multifunctional roles of flagella in pathogenesis. *FEMS Microbiol Lett* 2003; 224: 151-159.
- 105 Focke M, Feld A and Lichtenthaler HK. Allicin, a naturally occurring antibiotic from garlic, specifically inhibits Actyle-CoA syntetase. *FEBS Lett* 1990; 1 : 106 – 108.
- 106 Dalmo RA, Ingebrigtsen K and Bøgwald. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *J Fish Dis* 1997; 20 : 241 – 273.
- 107 Sobhana KS, Mohan CV and Shankar KM. Effect of dietary vitamin C on the disease susceptibility and inflammatory response of mrigal, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) to experimental infection of *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* 2002; 207 : 225 – 238.
- 108 Afifi SH, Al-Thobiati S and Hazaa MS. Bacteriological and histopathological studies on *Aeromonas hydrophila* infection of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) from fish farms in Saudi Arabia. *Assiut Vet Med J* 2000; 42 (84): 195 – 205.

## 8. CUADROS

**Cuadro 1.** Sensibilidad bacteriana a los distintos extractos y OTC en cepas de referencia y *A. hydrophila*, medida en mm de zonas inhibitorias.

Cepas		Extractos				
		EM*	EAL*	EAF*	EE	OTC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	6	9	12	13	12
<i>Streptococcus faecalis</i>	ATCC 29212	6	9	16	23	22
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	6	10	21	21	23
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	6	10	22	23	29
<i>Escherichia coli</i>	K12 14RS19	6	15	23	12	31
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC 49140	6	11	21	32	25

\*Extractos de ajo (*Allium sativum*); extracto macerado (20µL), extracto liofilizado (80µg), extracto acuoso fresco (80µg) extracto estabilizado (20µL) Biodegerm® y OTC(30µg).

**Cuadro 2.** Concentración mínima inhibitoria del extracto acuoso fresco de ajo a diferentes diluciones en cepas de *Aeromonas*, expresado en milímetros promedio de las zonas inhibitorias.

Cepas	Diluciones				
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16
mm promedio de las zonas de inhibición					
<i>A. hydrophila</i>	25	21	14	9	7
<i>A. caviae</i>	25	21	15	9	7
<i>A. trota</i>	26	21	15	10	7
<i>A. veronii</i>	27	21	16	11	7
<i>A. v. b. sobria</i>	27	22	18	9	7

Las concentraciones del extracto acuoso fresco de ajo por dilución por disco fueron el equivalente en sólidos de 80µg (1:1), 40µg (1:2), 20µg (1:4), 10µg (1:8) y 5µg (1:16).

**Cuadro 3.** Efecto bactericida del extracto acuoso fresco (EAF) de ajo en 48 cepas de *Aeromonas*, expresados por diluciones en proporción de cepas sensibles a moderadamente sensibles y resistentes.

CEPAS	Diluciones del EAF de ajo										Categoría
	1:1		1:2		1:4		1:8		1:16		
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	29/29	100	26/29	90	12/29	41	2/29	7	1/29	3	<b>S</b>
	0/29	0	3/29	10	17/29	59	27/29	93	28/29	97	<b>R</b>
<i>Aeromonas caviae</i>	6/6	100	6/6	100	3/6	50	0/6	0	0/6	0	<b>S</b>
	0/6	0	0/6	0	3/6	50	6/6	100	6/6	100	<b>R</b>
<i>Aeromonas trota</i>	6/6	100	6/6	100	4/6	67	1/6	17	0/6	0	<b>S</b>
	0/6	0	0/6	0	2/6	33	5/6	83	6/6	100	<b>R</b>
<i>Aeromonas veronii</i>	4/4	100	4/4	100	2/4	50	1/4	25	0/4	0	<b>S</b>
	0/4	0	0/4	0	1/4	25	3/4	75	4/4	100	<b>R</b>
<i>Aeromonas v. b. sobria</i>	3/3	100	3/3	100	3/3	100	1/3	33	0/3	0	<b>S</b>
	0/3	0	0/3	0	0/3	0	2/3	67	3/3	100	<b>R</b>

Las concentraciones del extracto acuoso fresco de ajo por dilución por disco fueron el equivalente en sólidos de 80µg (1:1), 40µg (1:2), 20µg (1:4), 10µg (1:8) y 5µg (1:16). (S) Sensibles a moderadamente sensibles y (R) resistentes.

**Cuadro 4.** Comparación de la actividad bactericida entre extractos y Oxitetraciclinas.

CEPA	EAL	EAF	EE	OTC
<i>A. hydrophila</i> ATCC 49140	7.33 <sup>c</sup>	17.17 <sup>a</sup>	20.17 <sup>a</sup>	19.33 <sup>a</sup>
<i>A. caviae</i> ATCC 88784	6.83 <sup>c</sup>	16.17 <sup>b</sup>	25.00 <sup>a</sup>	18.83 <sup>a</sup>
<i>A. v. b. sobria</i> ATCC 102831	6.50 <sup>b</sup>	17.83 <sup>a</sup>	18.33 <sup>a</sup>	19.33 <sup>a</sup>
<i>A. veronii</i> ATCC 98632	6.17 <sup>c</sup>	16.00 <sup>b</sup>	10.33 <sup>c</sup>	19.17 <sup>a</sup>
<i>A. trota</i> ATCC 102811	6.83 <sup>b</sup>	14.17 <sup>a,b</sup>	11.00 <sup>b</sup>	19.00 <sup>a</sup>
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	7.33 <sup>a</sup>	6.17 <sup>b</sup>	7.33 <sup>a</sup>	6.33 <sup>a,b</sup>
<i>S. faecalis</i> ATCC 29212	6.17 <sup>b</sup>	6.33 <sup>b</sup>	19.83 <sup>a</sup>	20.17 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i> ATCC 25922	7.17 <sup>b</sup>	17.17 <sup>a</sup>	17.33 <sup>a</sup>	19.83 <sup>a</sup>
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	6.17 <sup>c</sup>	12.33 <sup>b</sup>	21.83 <sup>a</sup>	26.17 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i> K12 14RS19	8.17 <sup>c</sup>	13.00 <sup>b</sup>	9.16 <sup>c</sup>	26.83 <sup>a</sup>

El análisis de varianza indica que las medias entre tratamientos por cepa con el mismo superíndice, **no son** diferentes con  $p > 0.05$ .

Concentración constante (20 $\mu$ g) en cepas de Aeromonas y de referencia; medido en mm promedio de zonas de inhibición.

**Cuadro 5.** Rangos establecidos de sensibilidad de cepas de referencia ante una concentración constante de tetraciclinas, expresados en mm de zonas de inhibición.\*

Cepas de referencia	Tetraciclinas µg /disco	Categorías	
		Resistente	Sensible
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	30	≤ 14	---
<i>S. faecalis</i> ATCC 29212	30	≤ 14	≥15
<i>E. coli</i> ATCC 25922*	30	≤ 17	≥18 – 25
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	30	≤ 23	≥24 – 30

Tomado del Manual NCCLS, 2002.

\*Valores de cepa tomados como referencia comparativa con las cepas de *Aeromonas*.

**Cuadro 6.** Comparación por tiempos de la velocidad del efecto bactericida del extracto acuoso fresco de ajo sobre tres cepas de *Aeromonas* y la solución control, medido en UFC / mL

Minutos	0		30		60		90		120		150	
	Tx	EA	FS	EA								
<i>A. hydrophila</i> ATCC 49140	1.16x10 <sup>7</sup> b	3x10 <sup>7</sup> b	0 a	4.2x10 <sup>7</sup> b	0 a	4.7x10 <sup>7</sup> b	3.33x10 <sup>5</sup> a	3.4x10 <sup>7</sup> b	0 a	6.1x10 <sup>7</sup> b	3.33x10 <sup>5</sup> a	3.8x10 <sup>7</sup> b
<i>A.v.b. sobria</i> ATCC 92225	5.14x10 <sup>7</sup> b	9.5x10 <sup>7</sup> b	5.5x10 <sup>7</sup> a	8.9x10 <sup>7</sup> b	2.66x10 <sup>7</sup> a	7.0x10 <sup>7</sup> b	2.7x10 <sup>7</sup> a	7.1x10 <sup>7</sup> b	1.36x10 <sup>7</sup> a	9.1x10 <sup>7</sup> b	6.0x10 <sup>5</sup> a	5.3x10 <sup>7</sup> b
<i>A. hydrophila</i> ATCC 87720	8.76x10 <sup>7</sup> b	1.1x10 <sup>8</sup> b	4.23x10 <sup>7</sup> a	1.5x10 <sup>8</sup> b	1.6x10 <sup>5</sup> a	1.4x10 <sup>8</sup> b	4.3x10 <sup>7</sup> a	1.2x10 <sup>8</sup> b	0 a	1x10 <sup>8</sup> b	1.33x10 <sup>6</sup> a	1.4x10 <sup>8</sup> b

UFC / mL con diferente letra representa diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el extracto acuoso fresco de ajo (EAF) y la solución de fosfatos como control (PBS); UFC / mL con la misma letra representa igualdad entre tratamientos ( $p > 0.05$ ).

**Cuadro 7.** Comparación entre tratamientos de los parámetros de calidad del agua obtenidos durante los bioensayos.

Parámetros	Tratamientos (valores promedio)					
	Manejo	Toxicidad	Ajo	OTC	Biodegerm <sup>®</sup>	Infección
Temperatura <sup>*</sup>	28 <sup>a</sup>	29 <sup>a</sup>	27 <sup>a</sup>	28 <sup>a</sup>	27 <sup>a</sup>	29 <sup>a</sup>
pH <sup>**</sup>	7.5 <sup>a</sup>	7.5 <sup>a</sup>	7.4 <sup>a</sup>	7.5 <sup>a</sup>	7.6 <sup>a</sup>	7.6 <sup>a</sup>
OD <sup>***</sup>	3.6 <sup>a</sup>	2.8 <sup>a</sup>	3.2 <sup>a</sup>	3.6 <sup>a</sup>	4.8 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>

\* Medido en °C; \*\* Medido en g [H<sup>+</sup>] / L; \*\*\* Medido en mg / L

Valores con el mismo superíndice entre tratamientos no son significativamente diferentes (p>0.05).

**Cuadro 8.** Comparación entre bioensayos de parámetros de calidad del agua tomados durante el experimento.

Parámetro	Bioensayo		
	1	2	3
Temperatura*	28.33 <sup>a</sup>	26.66 <sup>a</sup>	24.33 <sup>b</sup>
pH**	7.33 <sup>b</sup>	7.71 <sup>a</sup>	7.46 <sup>b</sup>
OD***	3.51 <sup>a</sup>	2.78 <sup>a</sup>	3.56 <sup>a</sup>

\* Medido en °C; \*\* Medido en g [H<sup>+</sup>] / L; \*\*\* Medido en mg / L

Valores con el mismo superíndice entre tratamientos no son significativamente diferentes (p>0.05).

**Cuadro 9.** Mortalidad de peces de cada tratamiento, observada durante los bioensayos.

Momento de Experimento	TRATAMIENTO					
	Manejo	Toxicidad	Infectados	EAF	OTC	EE
	NÚMERO DE PECES					
Siembra	90	90	90	120	90	60
Pre- terapia	87	73	77	112	77	54
Final	67	40	71	74	71	2

**Cuadro 10.** Ajuste de proporciones a porcentajes de mortandad en peces.

TRATAMIENTO	MORTALIDAD		VALORES	
	Proporción de organismos	Porcentaje	Obs.	Esp.
Manejo	10 / 87	11.5	3.3	9
Toxicidad	33 / 73	45.2	11	9
Ajo	38 / 112	33.9	9.5	9
Biodegerm	52 / 54	96.3	26	9
OTC	6 / 77	7.8	2	9
Infectados	6 / 77	7.8	2	9
		Totales	54	54

**Cuadro 11.** Comparación de tasas de mortalidad entre tratamientos, expresado en porcentajes.

Grupo	Mortalidad de peces entre Grupos		Grupo	Nivel de Significancia
	% mortalidad			
+ OTC	7.8 <sup>a</sup>	96.3 <sup>b</sup>	*Biodegerm	P < 0.05
+ OTC	7.8 <sup>a</sup>	33.9 <sup>b</sup>	*Ajo	P < 0.05
*Ajo	33.9 <sup>a</sup>	96.3 <sup>b</sup>	*Biodegerm	P < 0.05
*Ajo	33.9 <sup>a</sup>	11.5 <sup>b</sup>	◊◊ Manejo	P < 0.05
*Ajo	33.9 <sup>a</sup>	45.2 <sup>b</sup>	◊◊ Toxicidad	P < 0.05
◊ Infectados	7.8 <sup>a</sup>	11.5 <sup>a</sup>	◊◊ Manejo	P > 0.05
◊ Infectados	7.8 <sup>a</sup>	45.2 <sup>b</sup>	◊◊ Toxicidad	P < 0.05
◊◊ Manejo	11.5 <sup>a</sup>	45.2 <sup>b</sup>	◊◊ Toxicidad	P < 0.05

+ Control negativo, ◊ Control positivo, ◊◊ Controles y \* Tratamientos.

La prueba exacta de Fisher indica que los valores con el mismo superíndice entre tratamientos **no** son diferentes; valores con diferente superíndice entre tratamientos son diferentes.

**Cuadro 12.** Incidencia de infección a través de la proporción de bacterias reaisladas de zona lacerada en peces.

TRATAMIENTO	IDENTIFICACION					
	citocromo C oxidasa		aglutinación en			
			microplaca		Porta objetos	
	n*	%	n*	%	n*	%
Infectados	10/10	100	2/10	20	4/10	40
OTC	5/5	100	0/5	0	0/5	0
Toxicidad	5/5	100	0/5	0	0/5	0
Manejo	5/5	100	0/5	0	0/5	0
Biodegerm	2/3	66	0/3	0	0/3	0
Ajo	5/5	100	0/5	0	0/5	0

\* Proporción de cepas del total de cepas reaisladas de la zona epitelial lacerada e identificadas con **reacción positiva** al género *Aeromonas* o *Pseudomonas* por la prueba de citocromo C oxidasa e identificadas positivas a la especie *A. hydrophila* (ATCC 49140) por aglutinación.

**Cuadro 13.** Proporciones de hallazgos histopatológicos en epitelio de peces observados de los diferentes tratamientos durante la última fase del experimento.

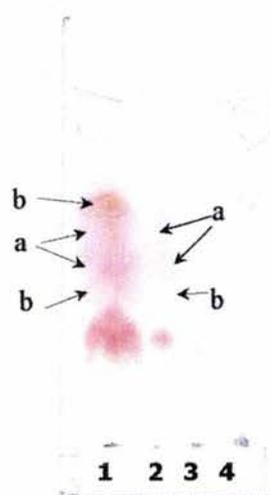
Tratamientos	Mecanismos de Defensa Primario		Hallazgo Proceso Inflamatorio				Reparación	
	Células Epitelioides	Células Caliciformes	Melano Macrófagos	Linfocitos	Monocitos	Heterófilos	Tejido Conjuntivo	Vasos de Neo- Formación
	Ajo	86.6	53.3	93.3	86.6	20	46.6	53.3
Biodegerm	100	50	100	100	50	100	50	50
Infectados	93.3	13.3	100	100	6.6	26.6	80.0	66.6
Manejo	80.0	40.0	93.3	100	80	80	53.3	20
OTC	86.6	53.3	100	93.3	6.6	33.3	66.6	73.3
Toxicidad	80.0	66.6	86.6	93.3	40	53.3	46.6	53.3

**Cuadro 14.** Proporciones de hallazgos histopatológicos en tejido muscular de peces observados de los diferentes tratamientos durante la última fase del experimento.

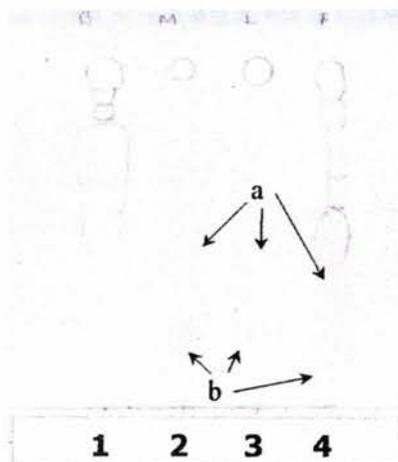
Tratamientos	Hallazgo								
	Proceso Inflamatorio				Cambios Patológicos			Reparación	
	Melano-macrófagos	Linfocitos	Monocitos	Heterófilos	Degeneración	Congestión Sanguínea	Necrosis	Tejido Conjuntivo	Vasos de Neo-Formación
Ajo	86.6	73.3	26.6	40	26.6	26.6	20	66.6	60
Infectados	100	100	26.6	20	33.3	40	26.6	40	33.3
Manejo	100	100	80	73.3	40	100	26.6	26.6	26.6
OTC	93.3	86.6	0	0	13.3	13.3	0	80	60
Toxicidad	100	100	93.3	93.3	6.6	13.3	6.6	66.6	93.3
Biodegerm	50	50	0	0	50	50	0	100	50

## 9. FIGURAS

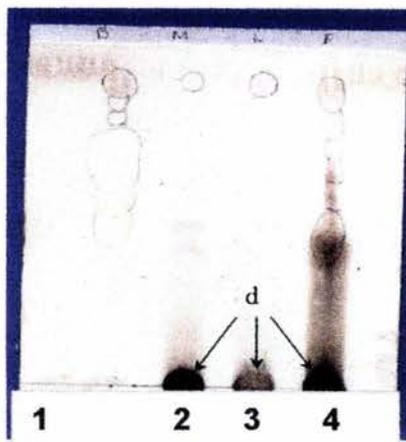
**Figura 4.** Cromatograma de referencia (revelada con ninhidrina), del extracto acuoso liofilizado (EAL) disuelto en: (1) agua destilada, (2) metanol, (3) diclorometano y (4) acetato de etilo. observación de grupos de compuestos, (a) derivados del amino ácido cisteina y (b) derivados del sulfóxido de cisteina.

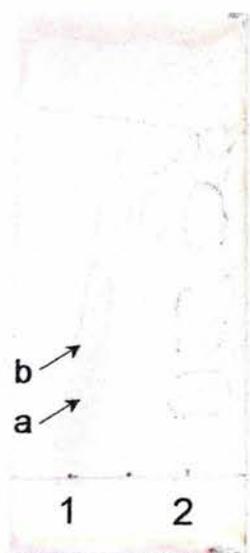


**Figura 5.** Cromatograma en placa fina (revelada con ninhidrina), de los extractos (1) EE, (2) EM, (3) EAL rehidratado, y (4) EAF. observación de grupos de compuestos, (a) derivados del amino ácido cisteina y (b) derivados del sulfóxido de cisteina.

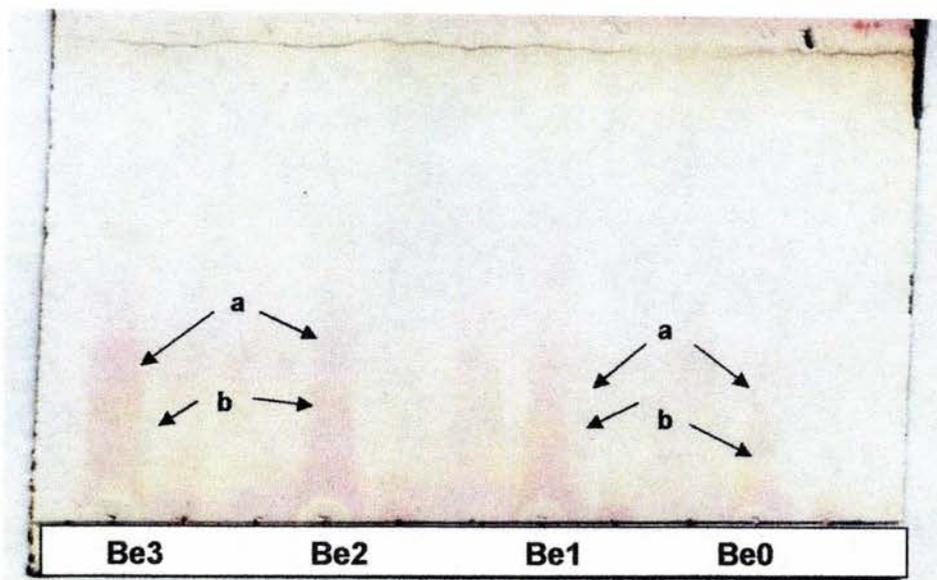


**Figura 6.** Cromatograma en placa fina (revelada con sulfato sérico), de los extractos (1) EE, (2) EM, (3) EAL rehidratado, y (4) EAF. observación de grupos de compuestos, (d) compuestos polares.

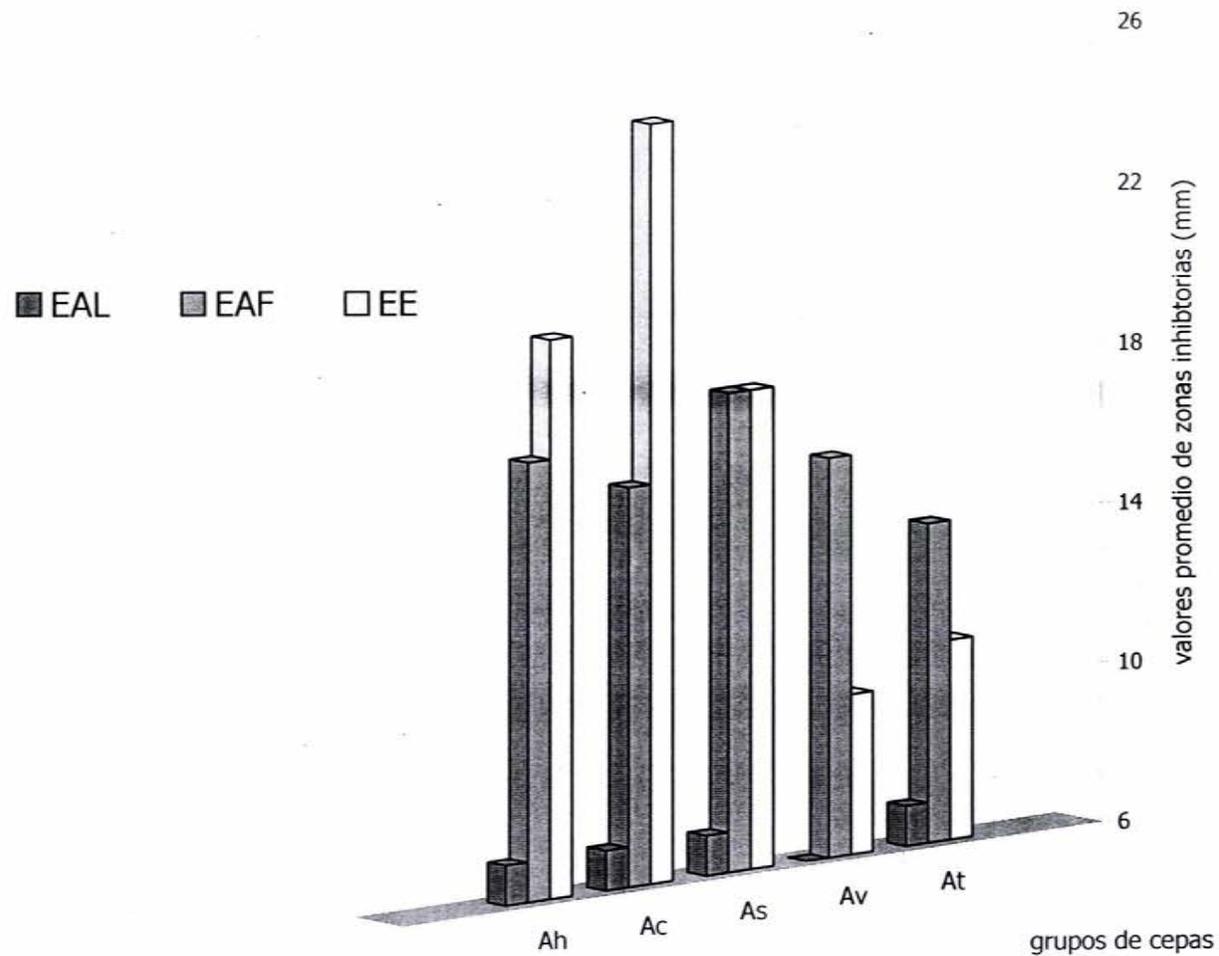




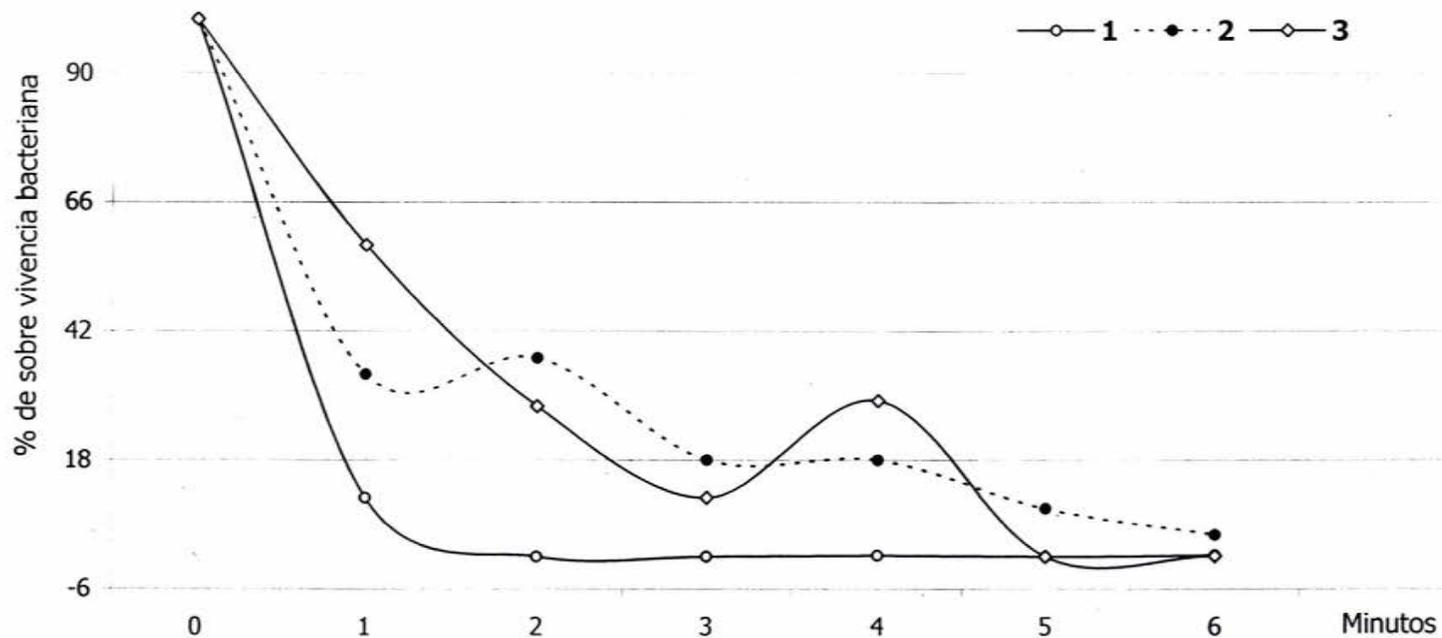
**Figura 7.** Cromatografía en placa fina (revelada con ninhidrina), de los extractos (1) EAF y (2) EE usados en la fase dos del experimento. Observación de grupos de compuestos, (a) derivados del amino ácido cisteína y (b) derivados del sulfóxido de cisteína en el EAF.



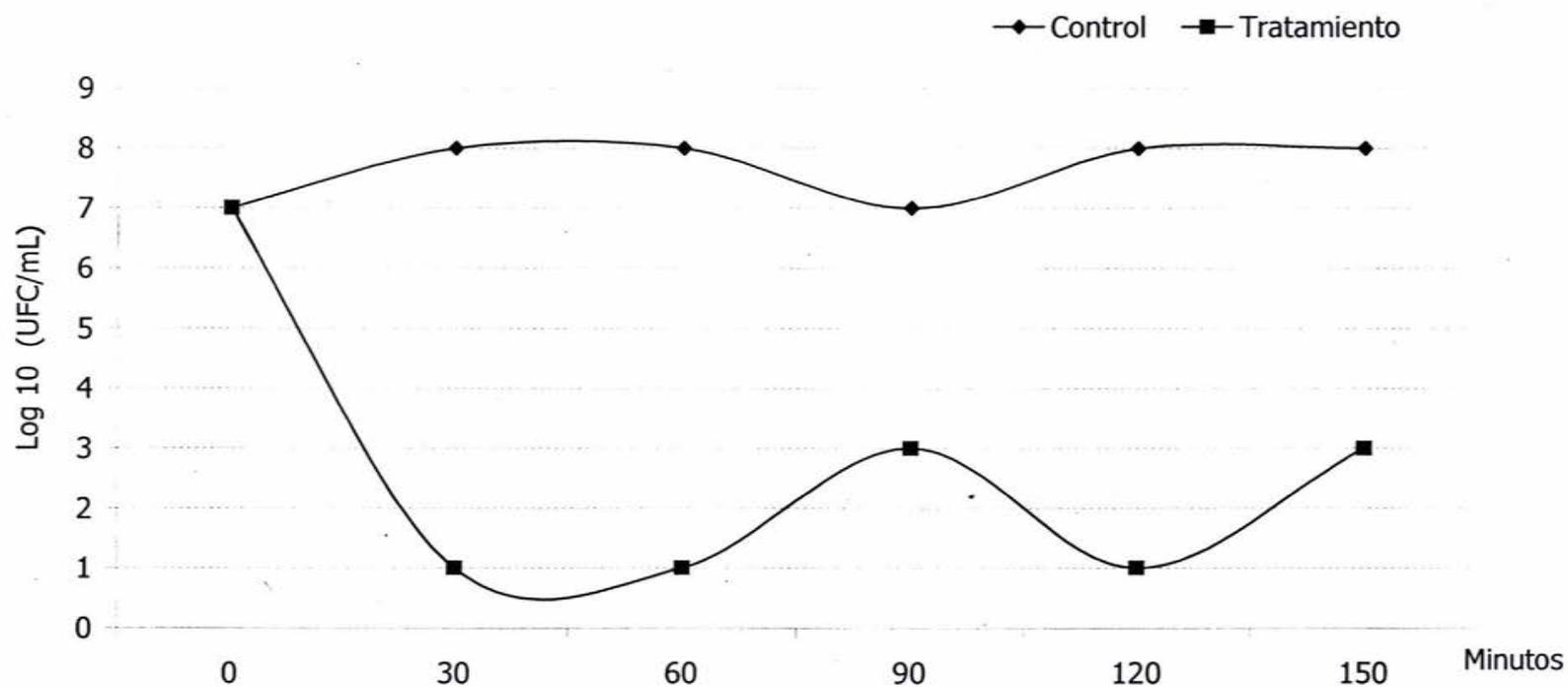
**Figura 8.** CPF de los extractos acuosos de ajo usados en la fase tres del experimento. extracto acuoso fresco del bioensayo 3, extracto acuoso refrigerado del bioensayo 2, extracto acuoso refrigerado usado en el bioensayo 1, extracto acuoso refrigerado usado en la fase *in-vitro* del experimento (Be0); (a) derivados del amino ácido cisteína y (b) derivados del sulfóxido de cisteína.



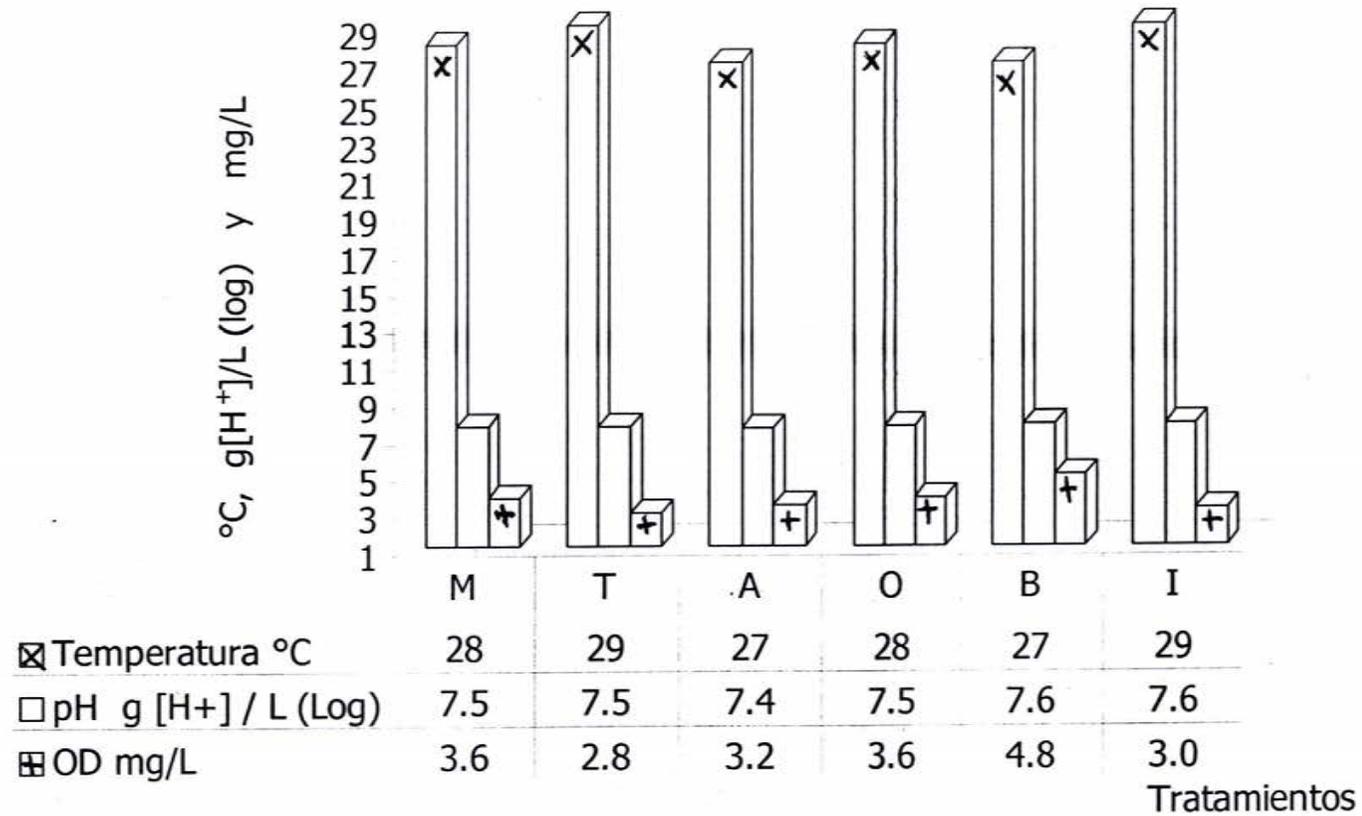
**Figura 9.** Efecto de los extractos acuosos liofilizado (EAL), acuoso fresco (EAF) y estabilizado (EE) en grupos de *A. hydrophila* (Ah), *A. caviae* (Ac), *A. v. b. sobria* (As), *A. veronii* (Av) y *A. trota* (At); expresado en promedios de zonas de inhibición.



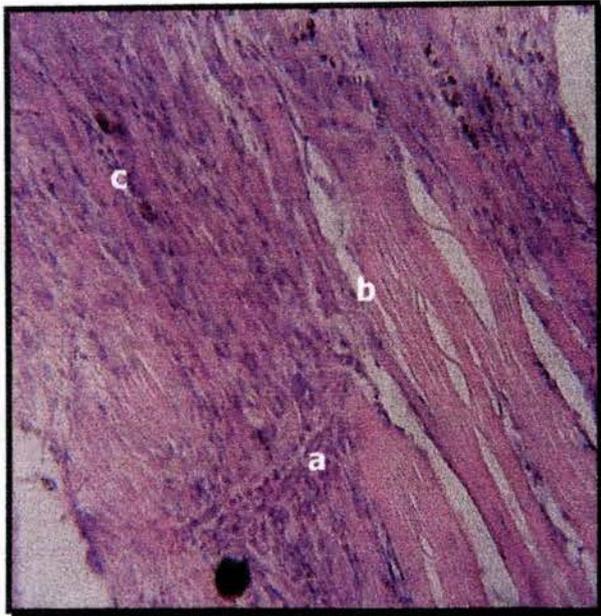
**Figura 10.** Comparación entre porcentajes de sobre vivencia y el tiempo necesario de exposición al extracto acuoso fresco de ajo (EAF) para destruir e inhibir el crecimiento de **(1)** *A. hydrophila* (ATCC 49140), **(2)** *A. v.b. sobria* (ATCC 92225) y **(3)** *A. hydrophila* (ATCC 87720).



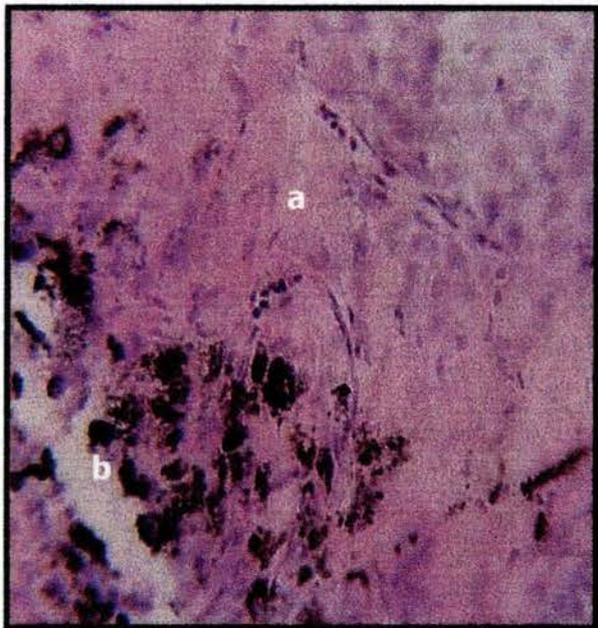
**Figura 11.** Correlación entre el efecto bactericida del EAF de ajo (dosis constante) y el tiempo necesario para destruir e inhibir el crecimiento de *Aeromonas hydrophila* (ATCC 49140) y el control con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) expresado en log 10 de las UFC/mL.



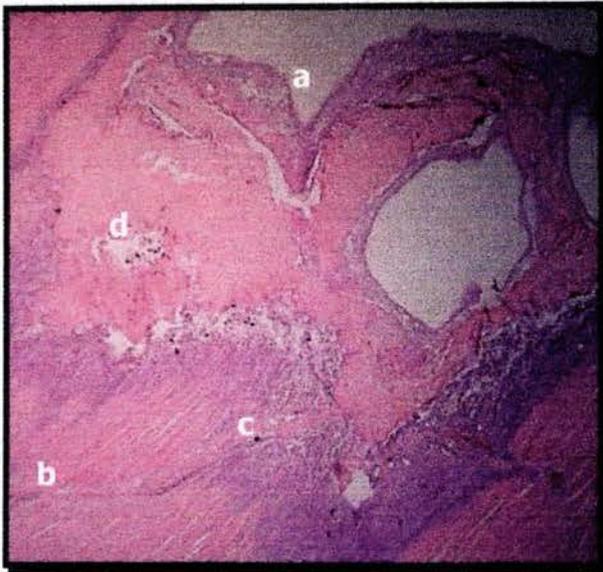
**Figura 12.** Promedios totales de los parámetros de agua observados durante los bioensayos en los tratamientos (M) manejo, (T) toxicidad, (A) extracto acuoso fresco de ajo, (O) OTC, (B) Biodegerm<sup>®</sup> e (I) infectados.



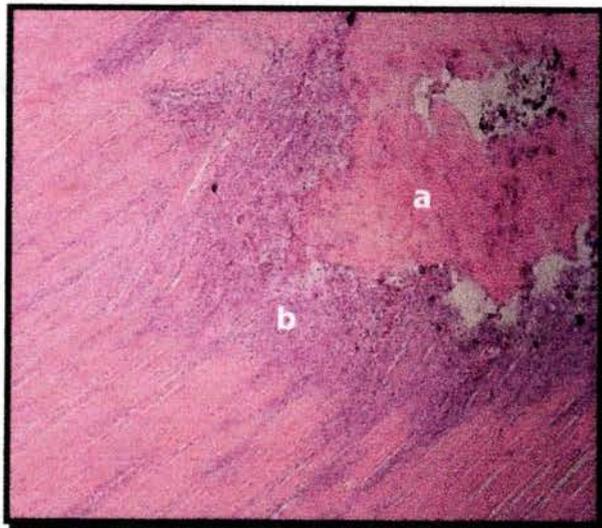
**Figura 13.** Sección histológica de capa muscular de organismo infectado y tratado con EAF. Apreciándose proliferación de vasos de neo formación (a), tejido conjuntivo (b) y escasas células inflamatorias (c) (H&E, 100 x).



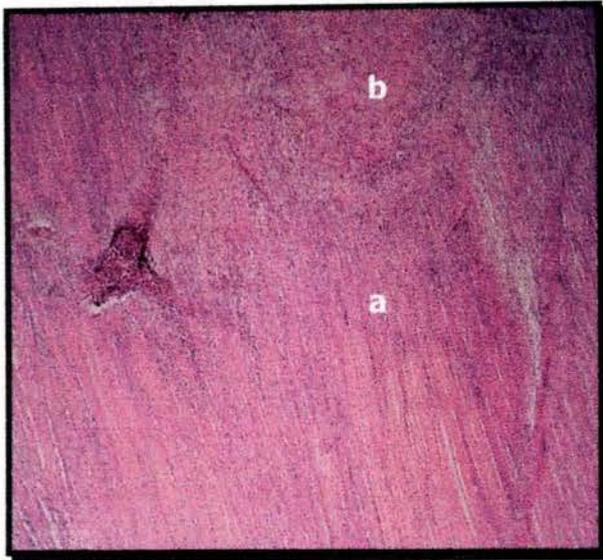
**Figura 14.** Histológica de piel, organismo infectado y tratado con EAF; detalle que muestra vasos sanguíneos de neoformación (a) a nivel de epidermis y melanomacrofagos (b) (H&E, 400 x).



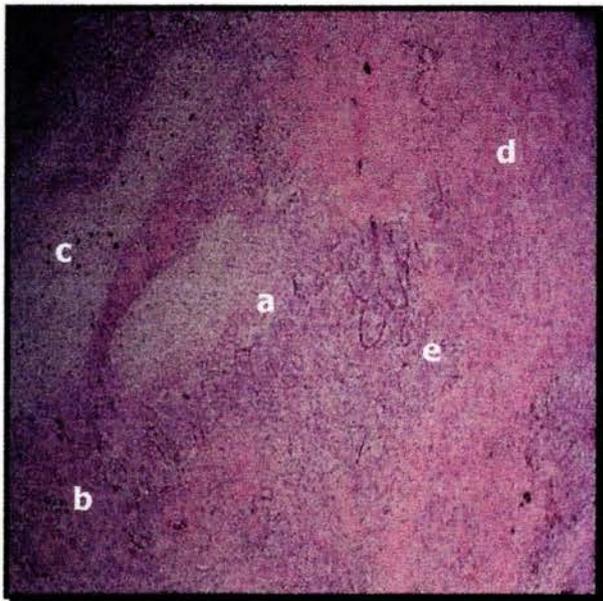
**Figura 15.** Aspecto general de lesiones en organismo infectado y tratado con EE, apreciándose los diferentes estratos: epidermis (a), área de lesión en proceso de reparación la cual se extiende hasta el estrato muscular (b) donde se observa infiltración de células inflamatorias (c) y fibrosis (d) (H&E, 40 x).



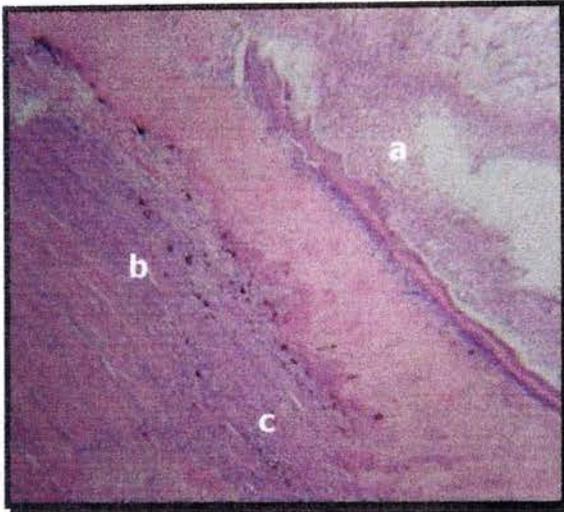
**Figura 16.** Detalle de los hallazgos histopatológicos en organismo infectado y tratado con EE, apreciándose fibrosis (a) e infiltrado de células inflamatorias (b) (H&E, 60 x).



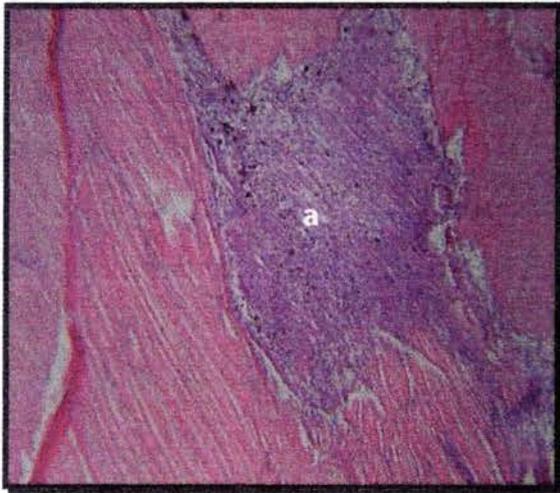
**Figura 17.** Aspecto panorámico de estrato muscular, de organismo infectado y tratado con OTC; las células inflamatorias (a) y los vasos sanguíneos de neoformación intercalados en zonas de reparación (b) se hacen evidentes en esta imagen poli-focal (H&E, 40 x).



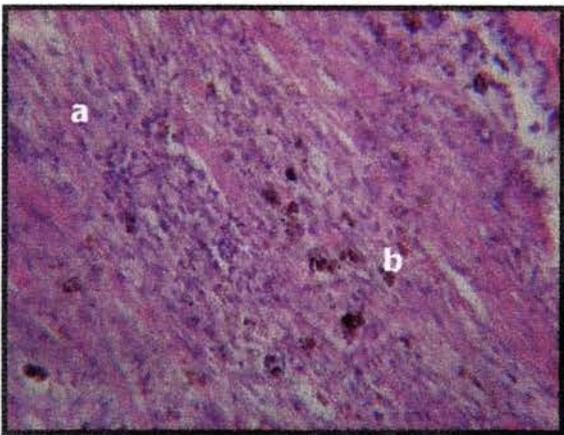
**Figura 18.** Epidermis de organismo infectado y tratado con OTC; proceso de reparación evidente, por la apreciación de hiperplasia de células caliciformes (a) y epitelioides (b), presencia de melano macrófagos (c), fibrosis (d) y vasos sanguíneos de neoformación (e) (H&E, 40 x).



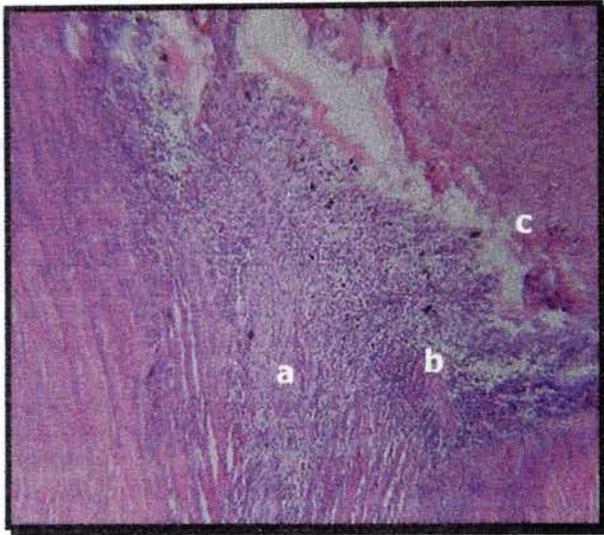
**Figura 19.** Vista panorámica de lesión en piel y músculo de pez infectado sin tratamiento; exhibidas las respuestas a la lesión de células caliciformes (a) y melanomacrófagos (b) e inflamación muscular (c) (H&E, 40 x).



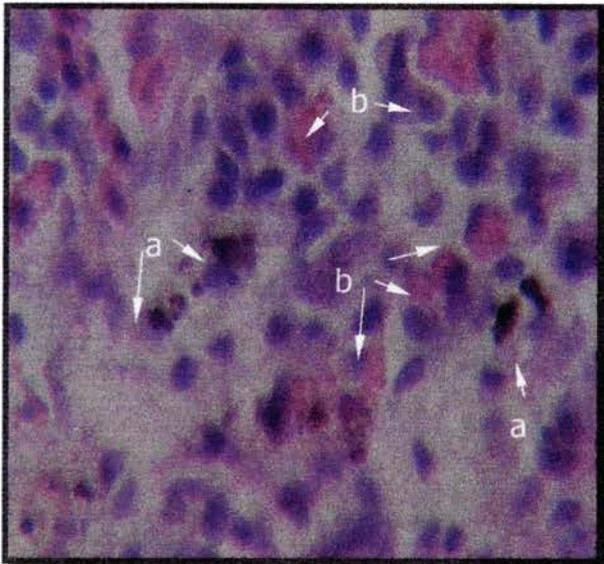
**Figura 20.** Tejido muscular de organismo infectado sin tratamiento; imagen de fibras musculares con moderadas células inflamatorias con distribución zonal (a) (H&E, 60x).



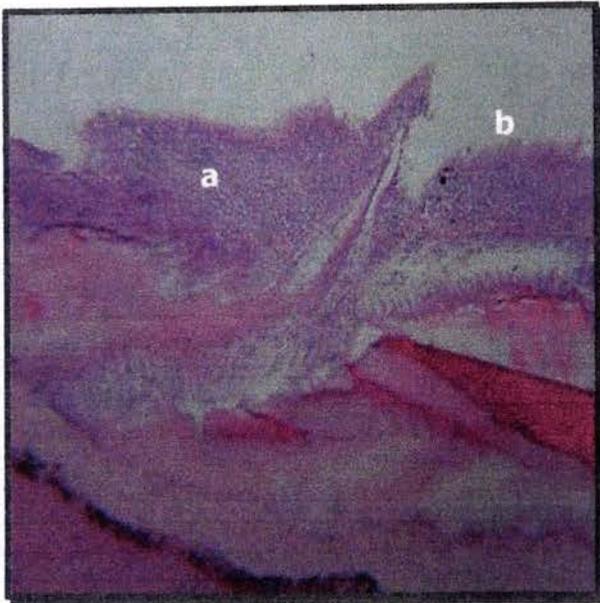
**Figura 21.** Acercamiento de tejido muscular de organismo infectado sin tratamiento con proceso inflamatorio severo (a) y necrosis (b) (H&E, 400x).



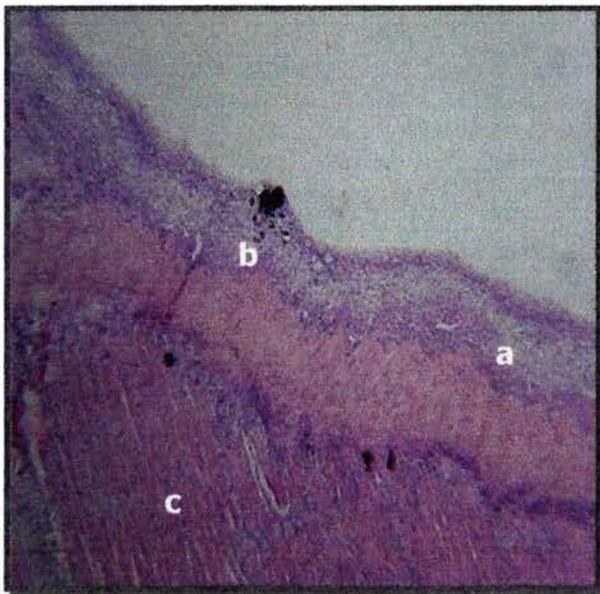
**Figura 22.** Sección histológica de organismo control de manejo; imagen a nivel de la interfase entre epidermis y estrato muscular, apreciándose proliferación abundante de tejido conjuntivo (a), células inflamatorias (b) y escasos melanomacrófagos (c) (H&E, 60 x).



**Figura 23.** Acercamiento de tejido muscular de un organismo control de manejo, encontrados como hallazgos Infiltrado linfocitario (A) y heterofílico (B) (H&E, 400 x).



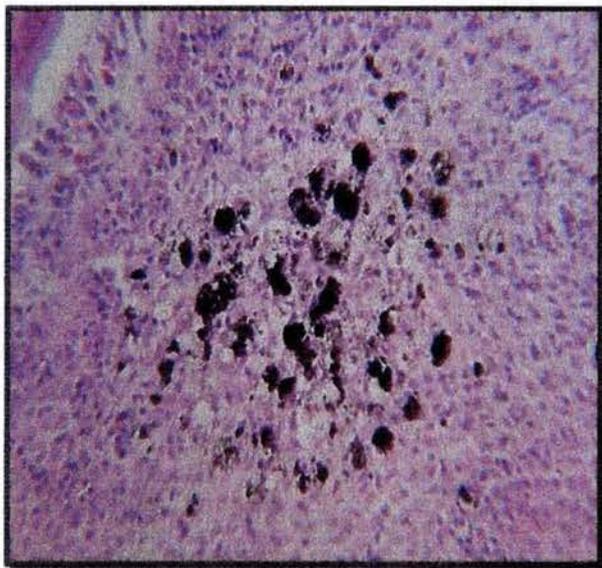
**Figura 24.** Sección de piel de organismo expuesto al EAF sin infección, apreciándose hiperplasia de células epiteliales y caliciformes (a), así como escasos melanomacrófagos (b) (H&E, 60 x).



**Figura 25.** Vista panorámica de epidermis, dermis y muscular de pez expuesto al EAF sin infección, que muestra hiperplasia de células caliciformes (a) y migración de melanomacrófagos (b), así como infiltración de células inflamatorias en capa muscular (c) (H&E, 40 x).



**Figura 26.** Sección histológica de pez expuesto a EAF sin infección. Imagen panorámica que muestra un cúmulo de melano macrófagos (a) contenido por hiperplasia de células epiteliales y caliciformes (b) y en fibras musculares leve infiltrado de células inflamatorias (c) (H&E, 40 x).

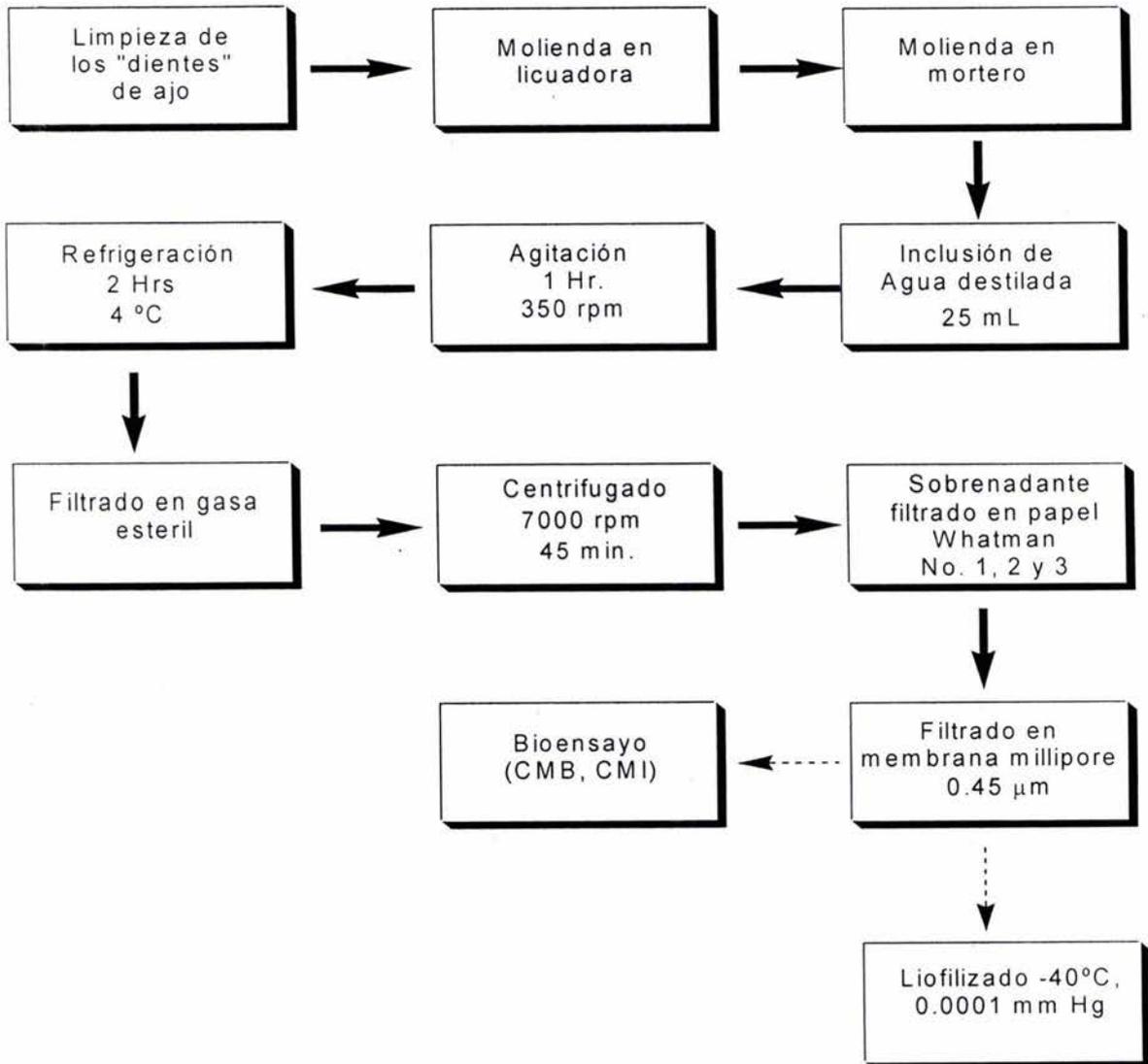


**Figura 27.** Detalle de melanomacrófagos fuertemente cargados de melanina, hiperplasia de células epiteliales y caliciformes; organismo expuesto al EAF sin infección bacteriana (H&E, 400 x).

## 10. ANEXO

### A. FASE UNO

**A.1.** Representación de la técnica usada para obtención de extracto de ajo fresco y liofilizado.



## B. FASE DOS

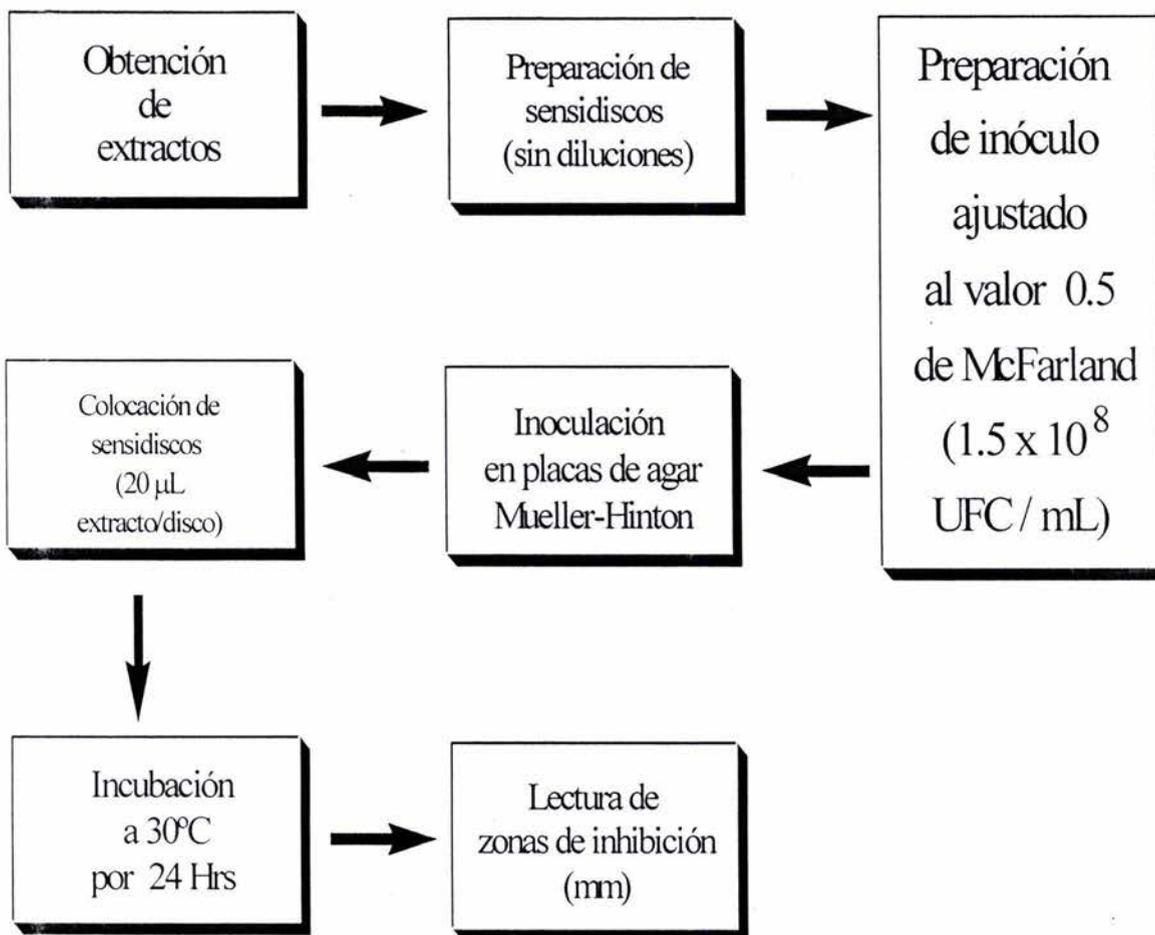
### B.1. Cepas bacterianas utilizadas en la primera fase del experimento.

<b>Cepa</b>	<b>Clave</b>	<b>Cepa</b>	<b>Clave</b>
<i>A. v. b. sobria</i>	087201	<i>A. hydrophila</i>	099271
<i>A. hydrophila</i>	087202	<i>A. hydrophila</i>	099275
<i>A. trota</i>	087203	<i>A. hydrophila</i>	099286
<i>A. hydrophila</i>	087204	<i>A. hydrophila</i>	099309
<i>A. trota</i>	087206	<i>A. veronii</i>	099340
<i>A. hydrophila</i>	087720-E74094	<i>A. hydrophila</i>	099352
<i>A. hydrophila</i>	087721-E74089	<i>A. hydrophila</i>	099358
<i>A. hydrophila</i>	087722-E70681	<i>A. hydrophila</i>	099361
<i>A. v. b. sobria</i>	087724-E70058	<i>A. hydrophila</i>	099366
<i>A. hydrophila</i>	088781	<i>A. hydrophila</i>	099367
<i>A. caviae</i>	088784	<i>A. caviae</i>	099755
<i>A. hydrophila</i>	088819	<i>A. trota</i>	100833
<i>A. hydrophila</i>	092215	<i>A. hydrophila</i>	102809
<i>A. trota</i>	092217	<i>A. trota</i>	102811
<i>A. hydrophila</i>	092221	<i>A. hydrophila</i>	102813
<i>A. v. b. sobria</i>	092225	<i>A. caviae</i>	102814
<i>A. hydrophila</i>	092228	<i>A. hydrophila</i>	102815
<i>P. aeruginosa</i>	096256-027853	<i>A. caviae</i>	102816
<i>S. foecalis</i>	096325-029212	<i>A. hydrophila</i>	102817
<i>A. hydrophila</i>	096453	<i>A. hydrophila</i>	102830
<i>A. hydrophila</i>	096454	<i>A. v. b. sobria</i>	102831
<i>A. trota</i>	097361	<i>A. hydrophila</i>	102833
<i>A. caviae</i>	097363	<i>A. trota</i>	102834
<i>A. hydrophila</i>	098135	<i>A. caviae</i>	102835
<i>A. hydrophila</i>	098152	<i>A. hydrophila</i>	49140
<i>A. veronii</i>	098632	<i>E. coli</i>	02592
<i>A. veronii</i>	098639	<i>S. aureus</i>	02592
<i>A. veronii</i>	098641	<i>E. coli</i>	K12 14RS19

**B.2.** Formulaciones de las soluciones "madre".

$$\frac{\text{Contenido / disco.}(\mu\text{g})}{\text{Cantidad / disco.}(\mu\text{l})} = [\mu\text{g} / \text{mL}] \text{ para OTC, EAF y EAL.}$$

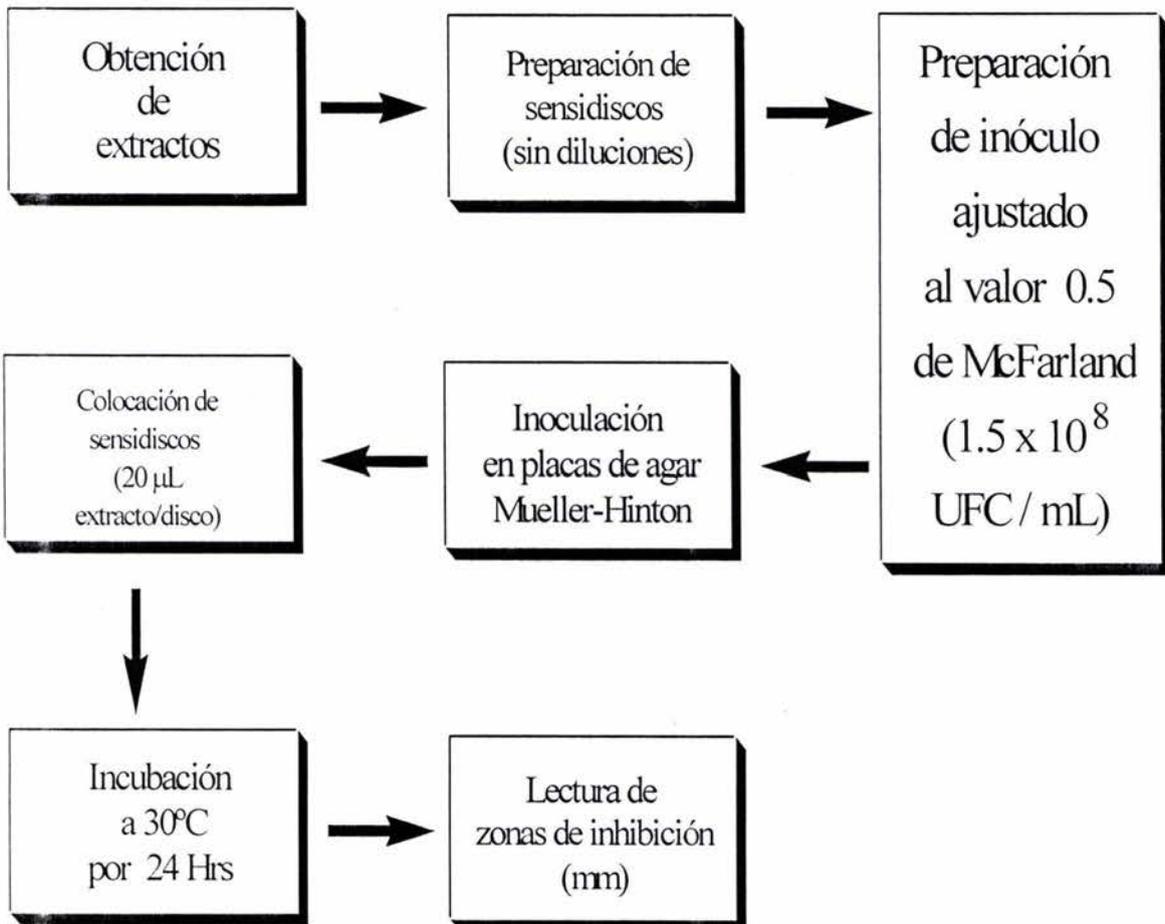
**B.3.** Representación del procedimiento seguido para las pruebas de sensibilidad bacteriana a los extracto acuoso fresco y extracto liofilizado.



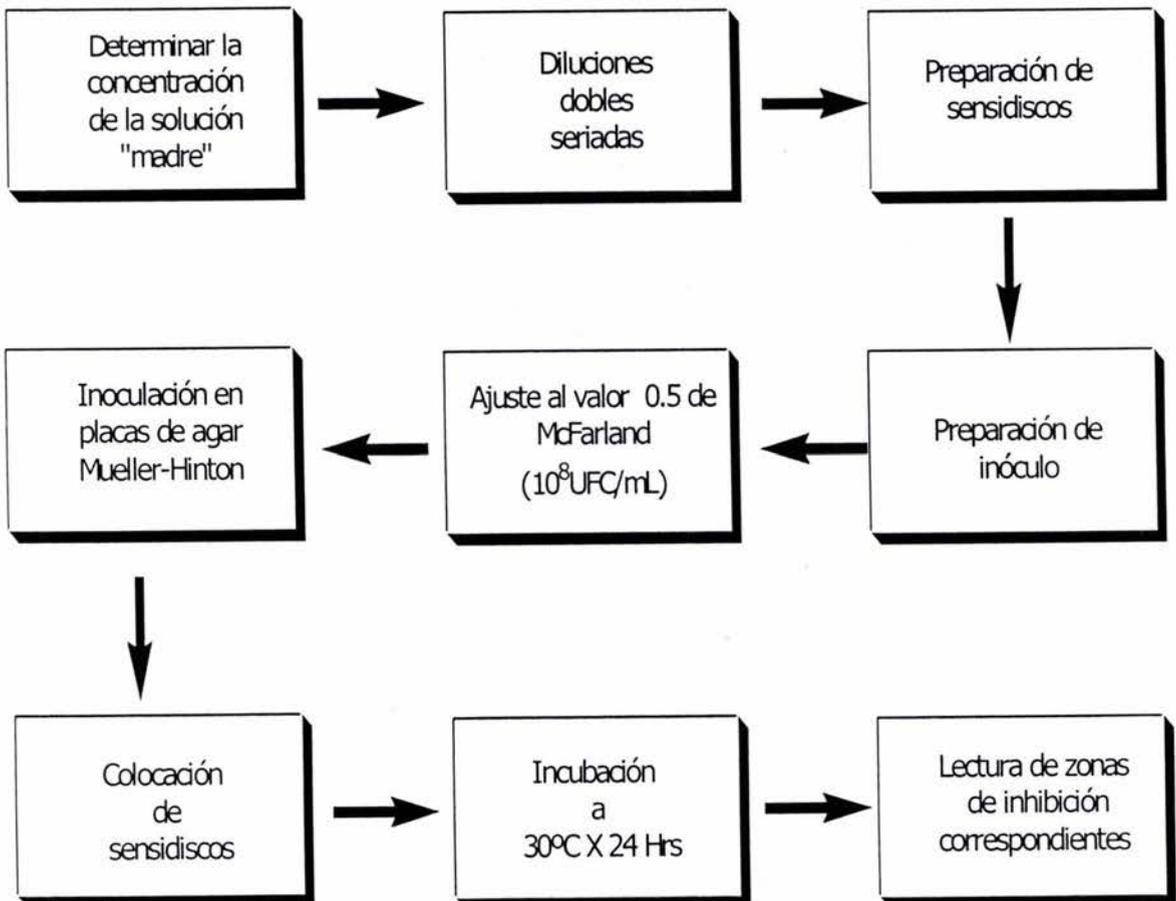
**B.2.** Formulaciones de las soluciones "madre".

$$\frac{\text{Contenido...disco.}(\mu\text{g})}{\text{Cantidad...disco.}(\mu\text{l})} = [\mu\text{g} / \text{mL}] \text{ para OTC, EAF y EAL.}$$

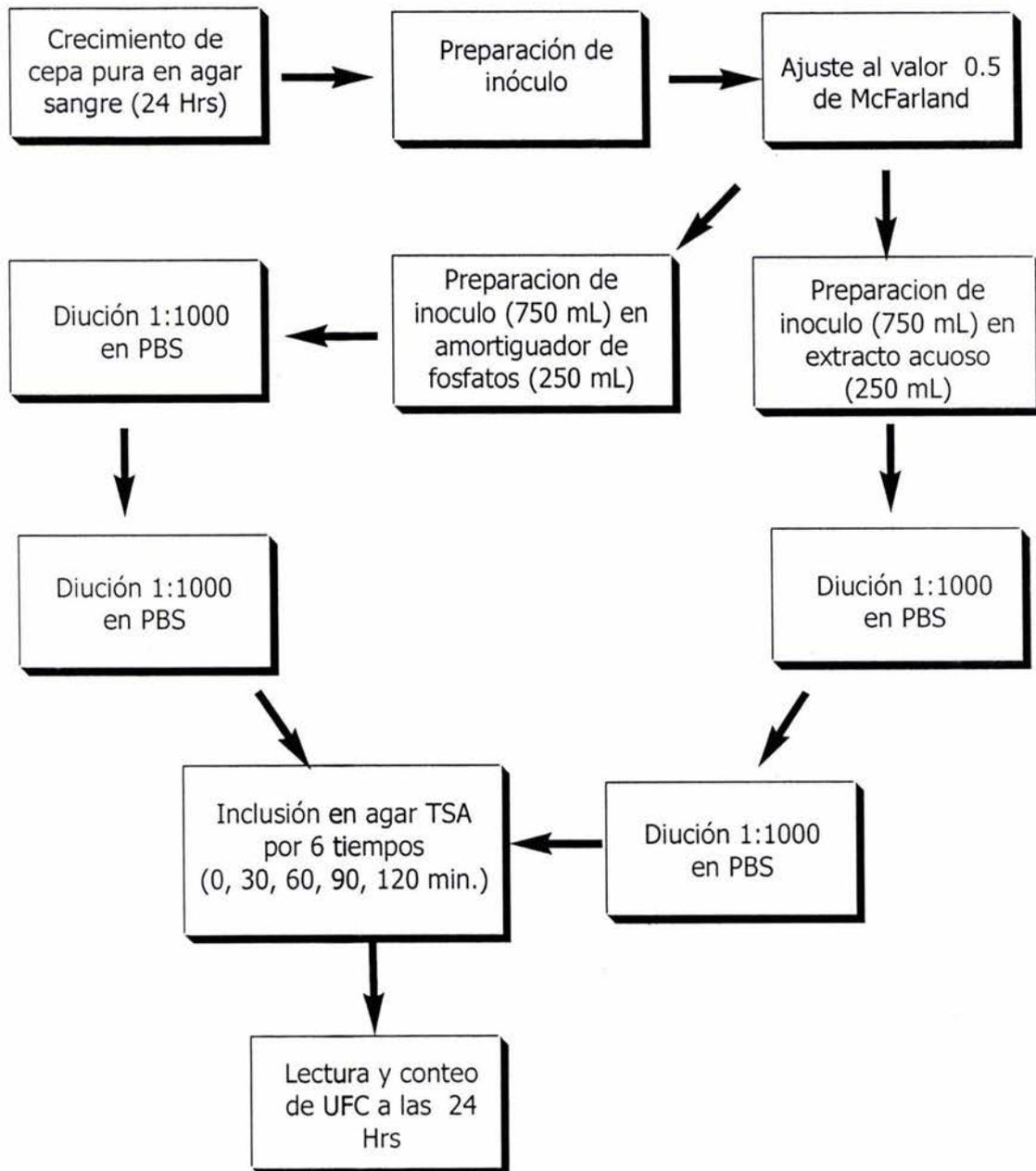
**B.3.** Representación del procedimiento seguido para las pruebas de sensibilidad bacteriana a los extracto acuoso fresco y extracto liofilizado.



**B.4.** Método utilizado para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida de los extractos acuosos fresco y extractos acuoso liofilizado.



**B.5.** Representación de la Técnica usada para evaluar el efecto bactericida del EAF basado en tiempo.



## C. FASE TRES

**C.1.** Representación de la distribución de tratamientos en acuarios. (A) organismos tratados con extracto de ajo, (B) organismos tratados con extracto estabilizado -Biodegerm®- (O) organismos tratados con OTC, (I) organismos infectados sin tratamiento, (M) organismos manejados sin infección ni tratamiento y (T) organismos manejados sin infección con tratamiento.

A1	T2	I3
O1	I2	M3
I1	A3	B1
B3	M2	T3
M1	O2	A2
T1	B2	O3

**C.2.** Protocolo de administración de antígeno en conejo Nueva Zelanda para obtención de suero.

<b>Día de Inmunización</b>	<b>Cantidad de antígeno</b>
0	0.5 mL
5	1.0 mL
10	1.0 mL
15	2.0 mL
20	2.0 mL

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

## ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS EN EL PRESENTE ESTUDIO

AS	Agar sangre	FDA	Siglas en ingles de la Contraloría de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration)
ATCC	Siglas en inglés de la Colección Americana de Cultivos Tipo (American Type Culture Colection)	M-H	Mueller Hinton
BH	Base húmeda, % de rendimiento incluida el agua	NCCLS	Siglas en inglés de el Comité Nacional de Estándares Clínicos de Laboratorio
BS	Base seca, % de rendimiento de sólidos	NOM	Norma Oficial Mexicana
CPF	Cromatografía en Placa Fina	OD	Oxígeno disuelto en agua
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria	OMS	Organización Mundial de la Salud
CMB	Concentración Mínima Bactericida	OTC	Oxitetraciclinas
Cx	Control	PBS	Solución Amortiguadora de Fosfato
DL <sub>50</sub>	Dosis letal 50% de organismos	PV	Peso vivo o Peso Corporal
DL <sub>90</sub>	Dosis letal 90% de organismos	Rf	Distancia Relativa
EAF	Extracto Acuoso Fresco	SA	Suero Absorbido
EAL	Extracto Acuoso Liofilizado	SAD	Suero Absorbido sin complemento
EE	Extracto Estabilizado (Biodegerm <sup>®</sup> )	SS	Solución Salina
EM	Extracto Macerado	SSF	Solución Salina Fisiológica
FAO	Siglas en ingles de la Organización para la Agricultura y la Alimentación (Food & Agriculture Organization)	TCBS	Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa
		TSA	Agar Trypticasa Soya
		Tx	Tratamiento
		UFC	Unidades Formadoras de Colonia