

37
ej.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO**

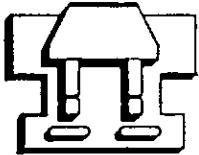
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
CAMPUS IZTACALA

**EVALUACION DEL EFECTO ANTIBACTERIANO
DE LA CEFALOTRINA (CQEPKA - 406 s (L))
CONTRA *Vibrio fluorens* EN TILAPIA
(*Oreochromis mossambicus*).**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
MARIBEL GARCIA RAMOS

DIRECTOR DE TESIS: M.V.Z. ANA AURO DE OCAMPO

ASESOR DE TESIS: M. EN C. JORGE MANUEL ROMERO JARERO



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEX.

1997 **B**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

2589A1



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 está 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.

AGRADECIMIENTOS

M.V.Z. Ana Auró de Ocampo, del Departamento de Acuicultura de la Facultad de Medicina Veterinaria. UNAM

M.en.C. Jorge Manuel Romero Jarero, del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. UNAM

M.V.Z. Jaime Alonso Navarro Fernández, del Departamento de Genética y Bioestadística. De la Facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia. UNAM

M.en.C. Luis Ocampo Camberos del Departamento de Fisiología y Farmacología. De la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM

M.en.C. Pilar Negrete Redondo del Departamento del Hombre y su Ambiente. De la unidad UAM XOCHIMILCO.

Amis revisores:

Mario A. Fernandez Araiza.
Alba Marquez Espinoza.
Martha E. Valdes Moreno.
Jose del Carmen Benitez Flores.
Ana Auró de Ocampo.

Que hicieron posible la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A MIS PADRES:
TERESA Y JOSÉ

Por soportar mis debates y por enseñarme a luchar por lo que deseo y disfrutar de mis logros por pequeños que sean.

LOS AMO

A MI ESPOSO
OTHON

Por sus consejos, apoyo y por ayudarme a encontrarme a mi misma pero sobre todo por tu amor.

TE AMO.

A MIS HERMANOS
EFREN, ELIZA Y JAVIER
Por brindarme su cariño, apoyo

A MIS SOBRINOS
ANGEL, SADAHI Y URIEL.
Esperando que este pequeño logro les sirva para guiarse en su vida futura profesional.

A mis profesores que me formaron.

A mis amigos: Victor, Angel, Silvia, Verónica, Maruca, Noemi, Rosa, Mercedes. Carmen, Martín, M.V.Z. Marcela Fragoso, Armando, José Luis por su amistad apoyo y consejos.

A las futuras Biólogas: Ana y Vanny
por estar conmigo en las buenas y en las malas.
las quiero mucho.

A todos los animales que dan sus vidas para el progreso de la ciencia.

CONTENIDO

I RESUMEN

II INTRODUCCIÓN

III ANTECEDENTES

III.1. Características del Vibrio

III.1.1 Morfología

III.1.2 Patogenicidad y epizootiología

III.1.3 Cuadro clínico

III.2. Parámetros ambientales óptimos para el mantenimiento de la tilapia

III.3. Característica del antibiótico

III.3.1 Fluoroquinolona

III.3.1.1 Mecanismos de acción

III.3.1.2 Toxicidad

III.3.2 Cefalosporina

III.3.2.1 Mecanismos de acción

III.3.2.2 Toxicidad

III.3.3 Cefaquinolona

III.3.3.1 Antecedentes

III.3.3.2 Desarrollo químico

III.3.4 Antecedentes de trabajos

IV Objetivos e hipótesis

V Material y método

V.1 Obtención de la cepa e identificación

V.2 Preparación del medio sólido para la siembra y medio líquido para las diluciones

V.3 Preparación del agua para los organismos

V.4 Dosificación con el medicamento en el alimento y en el agua

VI Resultados

VII Análisis

VIII Conclusiones

IX Sugerencias

X Anexos

XI Referencias bibliográficas

I. RESUMEN

Uno de los principales problemas que afecta considerablemente la acuicultura de agua dulce y marina es sin duda la presencia de organismos patógenos como es el de la familia *Vibrionaceae* dentro del cual se encuentra especie *Vibrio fluorens* la especie que produce en los peces tumefacciones, hemorragias en la base de las aletas, boca y branquias. Si estos organismos logran sobrevivir a la infección quedan con cicatrizaciones en la piel y esto disminuye su valor en el mercado.

Se realizó la investigación con la Cefaquinolona que es una mezcla de dos fármacos (fluoroquinolonas y cefalosporinas), una de sus características es que es de amplio espectro, para esta investigación se utilizó una bacteria gram negativa muy patógena y problemática en el medio acuático el *Vibrio fluorens*

Se infectó experimentalmente la tilapia con esta bacteria y se dosificó a diferentes concentraciones en dos formas distintas en el alimento y en el agua mostrando que era más efectiva la administración del antibiótico en el alimento ya que la mortalidad fue menor que la mortalidad obtenida al suministrar el antibiótico en el agua.

La concentración 50 de (CQEPCA 406 L (s)) "Cefaquinolona" suministrada en el alimento fue de 6.56 mg/Kg y la concentración 50 de (CQEPCA 406 L (s)) suministrado en el agua fue de 20.52 mg/Kg siendo el medicamento en el alimento 1.8634 más efectivo que el medicamento en el agua.

II. INTRODUCCIÓN

Desde que Banaveni describió por primera vez la vibriosis en peces en 1718 se inició el estudio de este género de bacterias hasta su aislamiento en 1893 por Canestrini. (McNeill, 1979). El organismo causal se denominó *Bacillus anguillarum* por haberse aislado de la *Anguilla anguilla*, el organismo causal de la llamada peste roja de las anguilas de agua dulce (Reichenbach, 1982). En este siglo se han identificado un amplitud de peces tanto tropicales como cultivadas en climas templados, que son afectados por la vibriosis. En países como Japón, algunos Europeos y los Estados Unidos se considera que la vibriosis es la enfermedad infecciosa que produce las mayores pérdidas económicas en los peces marinos cultivados, la cual se presenta también en especies cultivadas en agua dulce (Roberts 1982).

La familia vibrionacea se encuentra como habitante normal en el agua de mar (halofílicos), pudiéndose encontrar también en agua dulce y se considera como agente patógeno para los animales acuáticos.

El estudio de la vibriosis en peces fue principalmente descriptivo, posteriormente se dieron diagnóstico apropiado y recientemente se ha iniciado el interés por su terapia con antibióticos o su prevención por medio de vacunas, razón por la cual se conoce poco sobre el efecto de la eficacia de los agentes antibacterianos sobre esta enfermedad.

Algunas enfermedades relacionadas con el género *Aeromona* de la familia *Vibrionacea* tienen cierta semejanza con las producidas por el género *Vibrio* y son comunes tanto en anfibios como reptiles y peces, debido a que la *Aeromona* es habitante normal de agua dulce y salada, entre la enfermedad que produce se encuentran la gastroenteritis, disentería así como la furunculosis, esta enfermedad cuya distribución es mundial ya que afecta prácticamente a todas las especies de agua dulce, misma que ha motivado una intensiva investigación de más de 80 años en el campo de la inmunización con bacterinas.

Los primeros intentos para el control tanto de la vibriosis como de la furunculosis se realizaron antes de la Segunda Guerra Mundial mediante el empleo extensivo de fármacos antimicrobianos (Roberts 1982). La terapéutica con fármacos antimicrobianos generalmente se ha administrado directamente en el medio acuático con el propósito de desinfectar los estanques piscícolas, o bien mediante el suministro de alimento medicado con antibióticos o agentes quimioterapéuticos. La concentración empleada de antibióticos en el alimento va asociada con otras medidas profilácticas como la higiene de los estanques y el combate de parásitos o vectores transmisores de enfermedades, además de considerar las condiciones fisicoquímicas del ambiente acuático para evitar la inactivación o la dilución del principio activo terapéutico (Reichenbach 1982).

Entre las distintas estrategias terapéuticas de la *Vibriosis* se han empleado agentes quimioterapéuticos como la furazolidona, sulfonamidas y trimetoprim así como antibióticos tales como ampicilina y tetraciclina (Baron 1990), aunque existen reportes tanto de resistencia como de susceptibilidad a estos agentes, también se han utilizado antisépticos como azul de metileno, verde de malaquita, así como el desarrollo de agentes biológicos para inducir la inmunización como de vacunas comerciales contra *Vibrio anguillarum*

El reciente descubrimiento de los antibióticos sintéticos del grupo de las quinolonas, introducidas como agentes antibacterianos en 1964 con el ácido nalidixico, conjuntamente con otras de primera generación como la flumequina y el ácido oxalinico, los cuales mostraron alta eficacia contra gérmenes gram negativos en infecciones urinarias y entéricas, la subsecuente síntesis de las quinolonas de 2^{da} generación o fluoroquinolona con mayor actividad microbiana que los anteriores, incluye a las llamadas 4-quinolonas como la enrofloxacin, danofloxacin, ciprofloxacin, norfloxacin y ofloxacin.

Los reportes referentes a la *Vibriosis* en peces y su tratamiento con antibióticos no incluye como agente de elección a las quinolonas ni a las cefalosporinas (Barón 1990), no obstante la alta eficacia bactericida de las quinolonas a bajas concentraciones y a su baja toxicidad y a la nula resistencia bacteriana mediada por plasmidos, si bien los casos de resistencia se deben a la modificación de la estructura de la enzima de DNA-girasa (topoisomerasa), que es el blanco del mecanismo de acción de estos antibióticos.

Si bien las quinolonas en especial las de 2^{da} generación actúan eficazmente sobre gérmenes gram positivos, *E. coli*, *Proteus*, *Pseudomonas* y *Mycoplasmas*, resulta de importancia clínica la investigación de su actividad sobre *Vibrio* en particular cuando se combina con una cefalosporina. Dicha combinación, produciría un mezcla antibacteriana que fue determinada como Cefaquinolona presentando un amplio espectro antibacteriano que se espera produzca un efecto sinergista sobre el germen en casos clínicos inducidos en tilapia (Brander ,1985;Boot ,1988)

III. ANTECEDENTES

III.1 Características de Vibrio y de la vibriosis

III.1.2 Morfología

Son bastoncillos, aerobios, curvos o alargados, Gram negativos con movilidad que les da un flagelo polar, un flagelo adicional lateral, algunos pueden tener hasta 100 flagelos por célula (Barja *et al*, 1988). No forman esporas o microquiste. Quimiorganotrofos, y anaerobios facultativos capaces de realizar metabolismo respiratorio y fermentativos. Los vibrios se encuentran entre las bacterias más comunes en aguas superficiales en todo el mundo : Mar, lagos y en asociación con animales acuáticos.

Varias especies son patógenas al hombre, peces, anguilas, sapos otros vertebrados e invertebrados (Roberts, 1989).

III.1.2 Patogenicidad y epizootiología

Las vibriosis se consideran de distribución mundial, han sido reportadas en Norte y Sudamérica, así como países europeos.

Externamente pueden provocar hemorragias en la base de las aletas, en las branquias y dentro de la boca, así como en la superficie del cuerpo. Produce lesiones en el sistema circulatorio y en los ojos.

El intestino puede presentarse inflamado y con un fluido claro y viscoso. Se presentan hemorragias en hígado bazo y riñón. El periodo de incubación es de 3-8 días y éste depende de la temperatura del agua, virulencia de la cepa y el grado de " estres" en que se encuentra el pez (Jiménez, 1993).

III.1.3 Cuadro clínico

Los signos clínicos comunes para todas las formas de vibriosis en peces son los típicos de una septicémia hemorrágica, los signos externos son similares a los causados por otras bacterias Gram negativas tales como hemorragias en la base de las aletas (eritema, enrojecimiento de una zona); decoloraciones de la piel lesiones necróticas en la musculatura, que cuando alcanzan la epidermis pueden dar lugar a úlceras; exoftalmia y opacidad de corneal.

Los peces presentan lentitud en sus movimientos y tienden a agruparse en la superficie del agua (Jiménez, 1993).

III.2 Parámetros ambientales óptimos para el mantenimiento de la tilapia

Dentro de sus áreas originales de distribución, las Tilapias han colonizado hábitats mucho muy diversos: arroyos permanentes y temporales, ríos anchos y profundos o rápidos, lagos profundos, lagos pantanosos, lagunas dulces, salobres o saladas, alcalinas, estuarios y lagunas costeras e incluso hábitats marinos (Morales, 1974). Las Tilapias cultivadas

habitan por lo general aguas lénticas (poca corriente), permaneciendo en zonas poco profundas y cercanas a las orillas donde se alimentan y reproducen.

El rango natural de temperatura en el que habita la tilapia oscila entre 20° y 30° C; aunque pueden soportar temperaturas menores.

Todas las tilapias tienen una tendencia hacia hábitos alimenticios herbívoros debido a que presentan un largo intestino muy plegado, dientes bicúspides o tricúspides sobre las mandíbulas y la presencia de dientes faríngeos.

III.3 Características de Antibióticos

III.3.1 Fluoroquinolona

III.3.1.1 Mecanismos de acción

El sitio de acción de todas las quinolonas y fluoroquinolonas es la ADN girasa o topoisomerasa II, una enzima esencial para la replicación del material genético bacteriano.

La función de la ADN-girasa es vital para la replicación de los ácidos nucleicos bacterianos. Dicho material se encuentra apilado y la función del ADN-girasa consiste en convertir en lineal dicho material y girarlo en sentido contrario a la torsión normal de la doble hélice para permitir que el material genético se replique, transcriba, repare y recambie. Así la inhibición de estos procesos generará el bloqueo de múltiples funciones celulares, muchas de ellas vitales, de ahí el carácter bactericida de las quinolonas. Además, las fluoroquinolonas actúan a dos niveles en la ADN-girasa y se cree que matan a las bacterias por un efecto combinado de inhibición metabólica más la destrucción del material nuclear y aún de la ADN-girasa (Brander, 1991).

III.3.1.2 Toxicidad

Dado que la principal vía de eliminación es por la orina, se ha especulado que pueden inducir un daño ulterior en un riñón previamente insuficiente manifestado con nefritis intersticial y sangre oculta en orina. El daño suele ser leve y sólo ocurre a grandes dosis, no usadas en la clínica.

III.3.2 Cefalosporina

III.3.2.1 Mecanismos de acción

El *Cephalosporium acremonium* primera fuente de cefalosporinas que fue descubierto en 1948 siendo este el mecanismo de acción que inhibió la síntesis de la pared celular bacteriana en forma similar a la de la penicilina (Cruickshank, 1975).

III.3.2.2 Toxicidad

El antibiótico originalmente se aplica vía oral ó vía intravenosa, la mayoría de estas son metabolizadas nuevamente por el organismo y la cantidad restante es excretada en la orina, debido a esto puede presentarse una necrosis tubular renal si hay abuso de la administración de cefalosporinas (Goodma, 1986).

III.3.3 Cefaquinolona

III.3.3.1 Antecedentes

El último desarrollo de importancia mundial en el área de los medicamentos antibacterianos, han sido las fluoroquinolonas y cefalosporinas, denominadas de tercera generación. Debido al desarrollo de infecciones producidas por organismos altamente resistentes por la lentitud y escasez de nuevas opciones antimicrobianas, las investigaciones y aportaciones para combatir las infecciones, se han visto disminuidas en este rubro; debido a esto se modificó el grupo carboxilo del carbón 3 del anillo quinolónico dando como resultado **CQEPCA**. En los ensayos *in-vitro*, ha demostrado que su eficiencia antibacteriana es superior a la de las fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera generación.

III.3.3.2 Desarrollo químico

El concepto original para el desarrollo de la cefaquinolona, fue el de crear una nueva generación de cefalosporinas y fluoroquinolonas formando un híbrido.

Después de múltiples consideraciones tentativas de hibridación se concluyó que la mejor expectativa, era tratar de realizar una unión de un grupo fluoroquinolónico con un derivado del ácido 7-aminocefalosporánico formando un grupo carboxamido con el 7-Amino del núcleo lactámico para obtener un nuevo tipo de cefalosporinas y las posibilidades de sustituyentes en ambos núcleos, el quinolónico y el β -lactámico. Esta nueva serie de compuestos, se designó con el nombre genérico de “**cefalosporinas**”. En la estructura molecular de las cefaquinolonas, hay cuatro grupos sustituyentes; dos en el núcleo Fluoroquinolónico y dos en el grupo Cefalosporónico, lo que da como resultado la posibilidad de sintetizar más de dos mil compuestos (Corpi, 1995).

III.4 Antecedentes

En 1989 Markwart. D.T. *et.al.* realizaron un experimento sobre la tasa y asimilación de un antibacteriano en salmón chinook en función del tiempo y de químicos adicionados (surfactante y sales hiperosmótica). Estos surfactantes y cuatro niveles de antibacteriales se usaron para la evaluación de eficacia en eliminación de *Aeromonas salmonicida* que aparece en estado juvenil del salmón chinook. Todo el tratamiento eliminó a los portadores sintomáticos en 48 hrs. Los peces fueron monitoreados durante 10 días y no se descubrió reinfección.

En 1990 Lewis C.S. *et.al.* utilizaron ácido oxalínico y dos nuevas fluoroquinolonas: ciprofloxacina y norfloxacina haciendo una evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana contra *Aeromonas salmonicida* aunque el ácido oxalínico tiene una actividad como ciprofloxacina en términos de una Concentración Inhibitoria Mínima (MIC), tuvieron habilidad para matar a cepas resistentes de *Aeromonas salmonicida*.

En 1990 Bowser. P.R. *et.al.* en una prueba *in vitro* utilizaron 25 bacterias patógenas para peces para determinar la concentración mínima inhibitoria en tubos de diferentes diluciones. Utilizando enrofloxacin y ácido naladixico observándose que enrofloxacin da mejor resultado en 17 de 25 organismos.

En 1990 Hanstings. *et. al.* observaron que los componentes superficiales celulares y extracelulares de *Aeromonas salmonicida* tienen un antígeno protector en vacunas contra furunculosis. Sin embargo, mientras que los conejos producían anticuerpos a un mínimo de 25 proteínas, en la trucha arcoiris los anticuerpos solo aparecieron de 8 proteínas. Con base en este experimento se creó la técnica de western blotting útil para analizar la inmunogenicidad de diferentes antígenos y multicomponentes de las vacunas de *Aeromonas salmonicida*.

En 1991 Barnes *et.al.* realizaron en pollos pruebas con el ácido oxalínico y cinco nuevas fluoroquinolonas: sarafloxacin, enrofloxacin, PD 127, 319, PD 117, que tienen una elevada actividad *in vitro* contra *Aeromonas salmonicida*. sarafloxacin, enrofloxacin, PD 127, 319 y PD 117, tiene significativamente mayor actividad que cualquier ácido oxalínico, y son sensibles para *Aeromonas salmonicida* matando al 99% de las bacterias después de 1 hr.

Inglis. V. *et.al.* en 1991 observaron la concentración inhibitoria mínima (MIC), en 29 agentes antimicrobianos determinados para algunas cepas de *Aeromonas salmonicidas*. Se encontró que la concentración mínima inhibitoria de la fluoroquinolona fue cuatro veces menor cuando estaba a 10° C comparada a 22° C; no teniéndolos con amoxicilina, florfenicol o el sulfaclopiridazine-trimetropin combinados, teniendo rápidamente muertes de *Aeromonas salmonicida* a los 22° C por la fluoroquinolona y por lo cual el ácido oxalínico y amoxicilina tuvieron muertes al cabo de 24 hrs, y se demostró que florfenicol es un bacteriostático.

En 1993 Jeney G. *et. al.* realizaron baños de inmersión en soluciones inmunoestimulantes con la trucha arcoiris por 30 minutos anteriormente se realizaron dos baños de inmersión en *Aeromonas salmonicida*. La prueba de la actividad inmuno específica fue la responsable del monitoreo para contar plaquetas inespecíficas en las células y demostrar elevadas cantidades de anticuerpos. Los niveles de protección contra los virus fueron también incrementados cuando el pez fue cambiado 14 días más tarde, dando un baño inmunoestimulador antes de los antígenos inmunológicos para la prevención de enfermedades en peces.

Stroffregen D.A. *et.al.* en 1993 diagnosticaron tumefacciones en salmón comercial del Atlántico causados por *Aeromonas salmonicida* cultivados en jaulas en el mar y fueron tratados con enrofloxacin. La mortalidad fue reducida en un promedio de 5.8% por mes, a los dos meses siguientes fue de 0.6%. Para los adultos infectados al cabo de dos meses y medio la tasa de mortalidad fue de 2.6% y con el tratamiento de enrofloxacin fue de 0.3% en los dos meses subsecuentes a la terapia. El hígado eliminó los residuos aproximadamente en dos días, en tres días el riñón, en seis días las branquias, once días en músculos y veintidós días en piel. El producto reportado fue exitoso para la cosecha después de 180 días, con periodos de medicación libre.

Austin et al en 1993 observaron una enfermedad en peces, principalmente en piel con un alto nivel de mortalidad ocurrida en estado juvenil presentando un peso de 20 g en acuario con una temperatura de 25° C se identificó *Vibrio alginolyticus*, los organismos mostraron melanomas, absceso muscular y abdomen inflamado con líquido ascítico. Se hicieron inmersiones en 20 mg de cloramina por 15 minutos durante 3 días consecutivos habiendo resultado favorables.

Ahmed et al en 1994 observaron cientos de enfermedades en peces examinándolas clínicamente y microbiológicamente. Los signos clínicos incluyeron hemorragias en el cuerpo especialmente en el abdomen, ojos nublados, exoftalmia, ascitis, inflamación del orificio anal y congestión de los órganos internos. Fueron aisladas 15 especies de vibrios identificándolas mediante morfología y pruebas bioquímicas. Se hizo una infección experimental usándose las especies de la tilapia *mossambica* y *nilotica* mostrando similitud clínica. El *vibrio* sp tuvo una alta sensibilidad a estreptomycin, neomicin, netilmicin, oxitetraciclina y cloranfenicol.

Killie J. E. A. *et.al* en 1994 evidenciaron la supresión de anticuerpos responsables en peces, usando antígenos de haptenos dependientes. El salmón Atlántico fue inmunizado con antígenos proteicos. Estos estudios demostraron que la supresión e inducción intramolecular es un medio por el cual los anticuerpos responsables en peces están regulados, y el posible choque de la supresión inducción-antígeno es responsable en la respuesta inmune contra las vacunas de antígenos en peces.

Sakai- M et al 1995 realizó un experimento con la trucha arcoiris sometiéndola a 3 tratamientos consecutivamente, un grupo de truchas que pesaba aproximadamente 50 gr se infectó con *Vibrio anguillarum* vía intramuscular, administrándosele *C. butricum* (300 mg /Kg) vía oral, los organismos del otro grupo pesaron aproximadamente 10 gr se les infectó con *Vibrio anguillarum* vía intraperitoneal administrándoseles *C. butricum* (2.7×10^3 ufc y 2.7×10^4 ufc). La mortalidad de los peces de 50 gr fue de 10% con *butricum*, mientras que los organismos retados con (2.7×10^3 y 2.7×10^4) fue de 73% y 93% respectivamente. Concluyendo que la administración oral de *C. butricum* en trucha arcoiris aumenta la resistencia de la vibriosis.

En 1995 Laser . *et. al.* observaron que las mutaciones están determinadas por usar PCR, un producto que se utiliza para amplificar las quinolonas que determinan la resistencia de girasa y subsecuentemente de clonar la secuencia del producto PCR. La comparación de nucleótidos y derivados de aminoácidos en la secuencia de los productos PCR para quinolonas susceptibles y resistentes a serina, isoleucina substituida en la girasa A-proteínas dan resistencia a la separación. Una de las resistencias a la separación difiere para otros mientras que la fluoroquinolona y enrofloxacin llevan adicionalmente alanina y glicina substituida con igual contribución a la resistencia.

Elston R. *et.al.* en 1995 observaron que las fluoroquinolonas son semejantes a difloxacin teniendo un alto potencial para enfermedades bacterianas en peces, bajo una determinación viable de difloxacin en agua marina; este estudio se realizó a determinadas dosis de difloxacin en tratamiento de furunculosis en salmón del Atlántico. En los primeros ensayos, la mortalidad acumulativa en peces con el tratamiento diario con difloxacin con una dosis de 10.0, 5.0 y 2.5 mg/Kg durante 5 días tuvo significativamente baja mortalidad (38%) en peces inoculados con el patógeno.

IV. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la efectividad de CEFAQUINOLONA (CQEPKA 406 L (S)) para evitar la mortalidad de tilapia *Oreochromis mossambicus* infectada experimentalmente con *Vibrio fluorens*

OBJETIVOS PARTICULARES.

Determinar la dosis letal 50 del antibiótico Cefaquinolona en cinco dosis diferentes para evitar la mortalidad de los organismos en dos vías de administración. (alimento y agua).

Buscar la forma más efectiva de la aplicación del medicamento (mezclado en el alimento y aplicado directamente en el agua).

HIPÓTESIS

Al menos alguna de las siguientes concentraciones del medicamento (CEFAQUINOLONA) evitará la muerte de tilapias *Oreochromis mossambicus* infectadas experimentalmente con *Vibrio fluorens*.

Disuelto en alimento.

1.0 mg/Kg.
2.5 mg/Kg.
5.0 mg/Kg.
7.5 mg/Kg.
10.0 mg/Kg.

Mezclado en el agua.

2.0 mg/Kg.
5.0 mg/Kg.
10.0 mg/Kg.
15.0 mg/Kg.
20.0 mg/Kg.

V MATERIAL Y MÉTODO

V.1 Obtención de la cepa e identificación.

El *Vibrio fluorens* según API 20 (Técnica de identificación) (Analytical Profile, 1986) se obtuvo del cepario de colección del Laboratorio de Microbiología del Departamento del Hombre y su Ambiente UAM Unidad Xochimilco.

Se hicieron varias resiembras en BHI (infusión caldo cerebro corazón) y agar bacteriológico, la preparación del medio se explica en el anexo 1, posteriormente se hicieron tinciones de gram (Beishir, 1977). Para verificar que realmente era el microorganismo con el que se quería trabajar se cotejó en el microscopio de contraste de fase.

V.2 Preparación del medio para el crecimiento bacteriano.

Se elaboró el medio, caldo infusión cerebro corazón sin agar explicado en el anexo 2 el cual fue vertido en frascos viales de 60 ml de volumen con un contenido de 50 ml de la solución, se esterilizó durante 15 minutos, se dejó enfriar y se inoculó con el vibrio dejándose a 25°C durante 24 hrs en una placa de calentamiento. Ya que se obtuvo el crecimiento bacteriano se prepararon 5 tubos de ensayo con 9 ml de la solución salina fisiológica estéril de NaCl explicándose su preparación el anexo 3, se tomó de un frasco vial 1 ml de solución con crecimiento bacteriano con una micropipeta se agregó a un tubo de ensayo se agitó un poco para que la solución se homogenizara y esto se hizo sucesivamente hasta que se llegó al último tubo obteniendo una solución de 1×10^5 , con esta solución se llenaron 10 jeringas de insulina para inyectar a los peces vía intramuscular, con un mililitro de la solución.

V.3 Preparación de agua para los organismos.

- Los organismos que se utilizaron en este experimento fueron donados por el Departamento de Acuicultura de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Los cuales se utilizaron en etapa juvenil, siendo ésta la más afectada o atacada por las enfermedades (virus, bacterias y hongos) o por factores externos (temperatura, oxígeno, nitritos nitratos). (Pérez, 1989) con un peso corporal de 10 a 11 g, en el anexo 4 se muestran los pesos de los organismos que se utilizaron para estos dos bioensayos.

Se utilizaron frascos de vidrio de una capacidad de 4 litros los cuales se les introdujo 1 organismo por cada 2 litros de agua en cada frasco respectivamente; el agua y todos los organismos fueron tratados de la misma manera como se explica a continuación:

- El agua fue dechlorada con tiosulfato de sodio (solución madre de tiosulfato de sodio 30 gr por litro de agua), se le agregó a cada uno de los frascos de agua en experimentación 0.3 mililitros (solución madre) por litro de agua.

- A los frascos se les proporcionó aireación constante con una compresora y este fue regulado por llaves de paso, con una temperatura ambiental (20° C a 21° C) y con una temperatura del agua que oscilo entre 18° C y 21° C.

V.4 Dosificación con el medicamento en el alimento y en el agua

La cefaquinolona que se utilizó en este experimento fue donada por el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM

El medicamento fue suministrado en dos formas, mezclado en el alimento anexo 5 y disuelto en agua anexo 7, las dosis del medicamento (cefaquinolona) se basaron en datos ya planteados de quinolonas (Ribofloxacinas) utilizadas por Elston (1995). En el anexo 6 se muestran los cálculos que se realizaron para incorporar el medicamento en el alimento (1.0, 2.5, 5.0, 7.5 y 10 mg/kg) y en la tabla 1 se puede observar las diferentes concentraciones de medicamento con números más oscuros obtenidos de los cálculos que se muestran en el anexo 6.

- Las cantidades de cefaquinolona que se utilizaron en agua fueron de 2, 5, 10, 15 y 20 mg/Kg de peso corporal en el anexo 7 se muestran los cálculos para medicar a los peces suministrando de forma directa el medicamento en el agua esto fue para ver que tanta diferencia de mortalidad se encontraba cuando se duplicaba el medicamento, pero a su vez ver la efectividad de la variación del suministro del medicamento.

- Se hicieron 5 repeticiones por cada forma de aplicación (alimento y agua), del medicamento, cada repetición estuvo constituida por 25 organismos.

- La vía de infección bacteriana es normalmente oral pero para que se llevara este proceso se tendría que esperar aproximadamente 56 hrs para cada infección, para acelerar el proceso se inyectaron a los organismos con jeringas de insulina con un inoculo bacteriano de 1×10^5 (solución líquida de BHI diluida en una solución fisiológica de NaCl que ya se tenía preparada), se inyectaron los organismos vía intramuscular observándose signos físicos en un tiempo de 24 hrs (oscurecimiento de la piel y hemorragia en la base de las aletas, boca y opérculo) después se recurrió al medicamento (Ifui, 1994).

- El medicamento en el alimento como en el agua se administró una vez al día y a la misma hora.

- Cada repetición duro 4 días (Apha 1989) de lunes a jueves y el viernes se esterilizó toda el agua en un autoclave durante 15 minutos posteriormente se vacio a la tarja, los frascos se prepararon otra vez para empezar la siguiente dosificación nuevamente el lunes.

Los porcentajes de mortalidad de los grupos experimentales se compararon por medio de análisis probit (Kalant, 1989) se determino la DL_{50} (dosis del medicamento a la cual se estima que mueren o quedan protegidos el 50 % de los organismos expuestos).

Así mismo se obtuvieron modelos ajustados de cada grupo por medio de análisis probit, se determino la potencia relativa (Goth, 1990) entre los tratamientos y se realizo una prueba de hipótesis para comparar el coeficiente de regresión de dichos modelos, y poder determinar si las DL_{50} son distintas.

VI. RESULTADOS.

En los cuadros 2 y 3 se muestran los porcentajes de mortalidad (y sobrevivencia) de los organismos medicados, ya sea, en el alimento o en el agua respectivamente, a distintos niveles de dosificación de CQEPCA 406 L (s). Y en la figura 1 se muestra la dispersión de las tasas de mortalidad de cada grupo.

Con el propósito de determinar la DL_{50} en cada esquema de medicación, así como comparar las tasas de mortalidad de los grupos experimentales, se realizó el análisis probit correspondiente obteniendo para el grupo medicado en el alimento una DL_{50} de 6.85 mg/kg, mientras que para el grupo medicado en el agua dicho estimador fue: $DL_{50} = 20.52$ mg/kg.

Los modelos probit ajustados para cada grupo se muestran en las figuras 2 y 3, apartir de estos modelos se calculo la potencia relativa entre ambos grupos, para determinar la eficacia comparativa entre los dos sistemas de medicación obteniéndose que la medicación en el alimento fue de 1.8634 veces más efectiva que la medicación en el agua ver anexo 8.

Las manifestaciones clínicas al infectar experimentalmente a la tilapia *Oreochromis mossambicus* con *Vibrio fluorens* a una concentración de 1×10^5 , fue un movimientos rápido en ellos al nadar con respecto a lo normal, cuando se les inyectó la bacteria y al cabo de un rango de 20 a 40 minutos sus movimientos eran muy lentos, a las 24 hrs después de haber inoculado se observó oscurecimiento de la piel en algunos organismos, en otros se observaron hemorragias en las aletas opérculo, branquias, y exoftalmia. figura (4a,4b,4c y 4d).

MEDICAMENTO SUMINISTRADO EN EL ALIMENTO

GPO/REP	1	2	3	4	5	TOTAL	% mor	% sob
1.0 mg/Kg	5/5	5/5	4/5	4/5	5/5	23/25	92	8
2.5 mg/Kg	4/5	3/5	4/5	5/5	4/5	20/25	80	20
5.0 mg/Kg	3/5	4/5	3/5	3/5	4/5	17/25	68	32
7.5 mg/Kg	3/5	2/5	3/5	2/5	1/5	11/25	44	56
10.0 mg/Kg	2/5	1/5	3/5	2/5	1/5	9/25	36	68

Tabla. 2 Respuesta de los bioensayos con Tilapia *Oreochromis mossambicus* mostrando porcentajes de mortalidad y sobrevivencia infectadas con *Vibrio fluorens* y desafiado con la cefquinolona en el alimento.

MEDICAMENTO SUMINISTRADO EN EL AGUA

GPO/ REP	1	2	3	4	5	TOTAL	% mor	% sob
2.0 mg/Kg	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	24/25	96	4
5.0 mg/Kg	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	24/25	96	4
10.0 mg/Kg	5/5	4/5	5/5	4/5	3/5	21/25	84	16
15 mg/Kg	4/5	3/5	3/5	2/5	3/5	15/25	60	40
20 mg/Kg	3/5	2/5	3/5	3/5	1/5	12/25	48	52

Tabla.3 Resultado de mortalidad y sobrevivencia causada por *Vibrio fluorens* y tratados con la cefquinolona en el agua *Oreochromis mossambicus*.

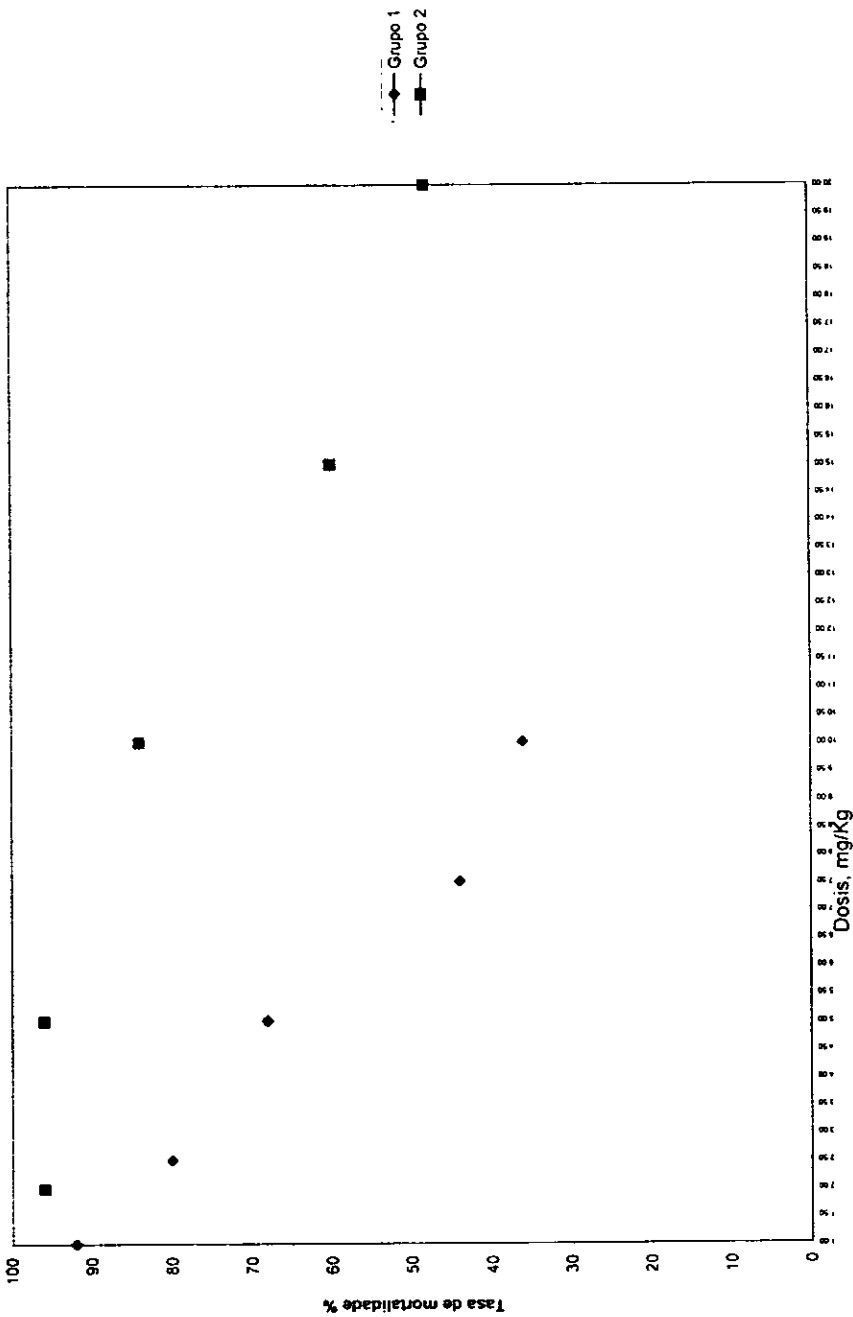


Figura 1. Dispersión de datos de la mortalidad de tilapia

GRUPO	DOSIS mg/Kg	Mort %	log Dosis(y)	Probit (x)
1	1.0	92	0.000	6.41
1	2.5	80	0.398	5.84
1	5.0	68	0.699	5.47
1	7.5	44	0.875	4.85
1	10.0	36	1.000	4.64
2	2.0	96	0.301	6.75
2	5.0	96	0.699	6.75
2	10.0	84	1.000	5.99
2	15.0	60	1.176	5.25
2	20.0	48	1.301	4.95

En el alimento

$$\log Dosis = 3.5682 - 0.54645 (\text{probit})$$

$$DL_{50} = \text{antilog} (\log \text{ dosis} / \text{probit } 5)$$

$$= \text{antilog} [\log \text{ dosis} / 3.5682 - 0.54645 (5)]$$

$$= \text{antilog} (\log \text{ dosis} = 0.8359)$$

$$= 10$$

$$= 6.8538 \text{ mg/Kg.}$$

En el agua

$$\log Dosis = 3.5323 - 0.04440 (\text{probit})$$

$$= \text{antilog} (\log / \text{probit } 5)$$

$$= \text{antilog} [\log / \text{dosis} / 3.5323 - 0.0444 (5)]$$

$$= \text{antilog} (\log \text{ dosis } 1.3123)$$

$$= 10$$

$$= 20.52 \text{ mg/Kg.}$$

Tabla 4 Datos obtenidos mediante la aplicación del análisis Probit.

PROBIT

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	6.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33

Tabla 5 Conversión de porcentajes a Probit para la linealización de los datos obtenidos experimentalmente.

Curva de mortalidad con alimento medicado

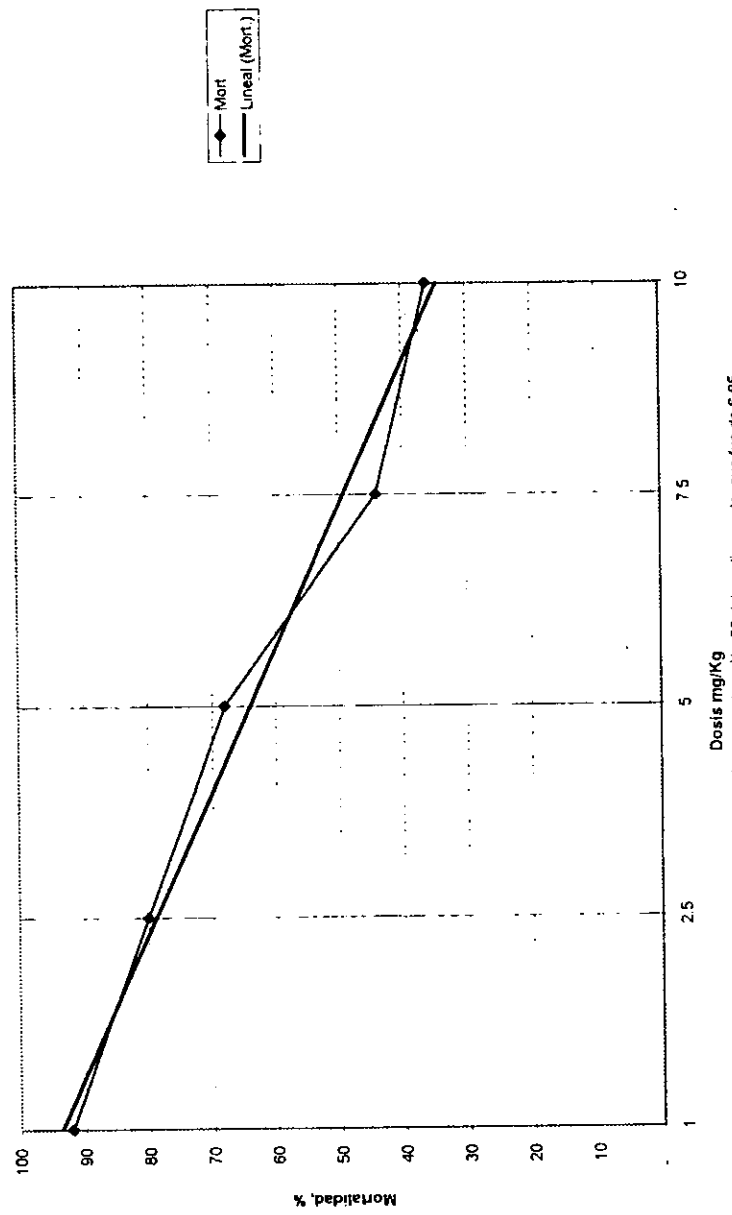


figura 2 En la gráfica se muestra La concentración 50 del medicamento que fue de 6.85

Curva de mortalidad con agua medicada

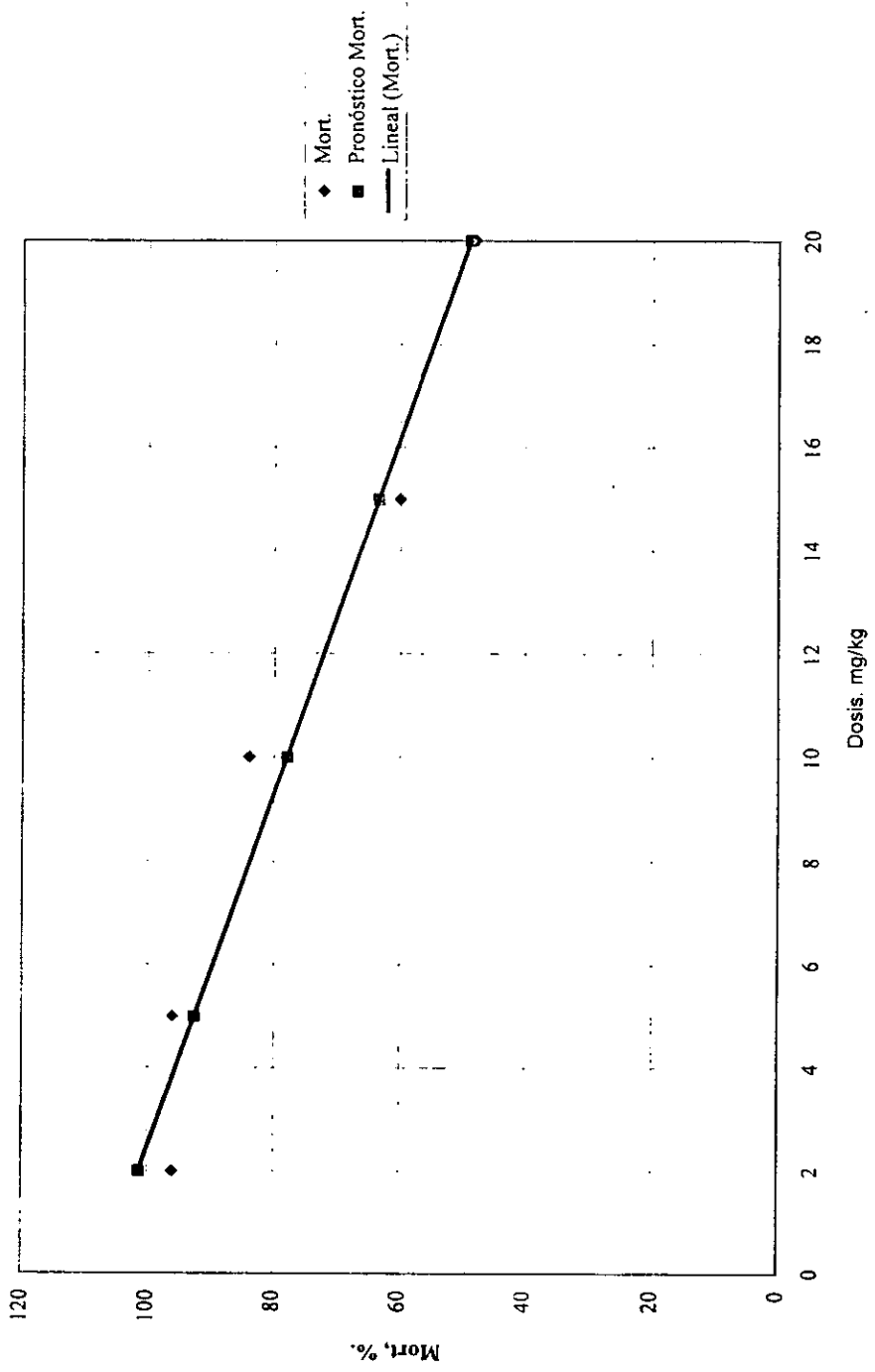


Figura 3. La gráfica muestra la concentración 50 del medicamento la cual fue 20.52 mg/kg.

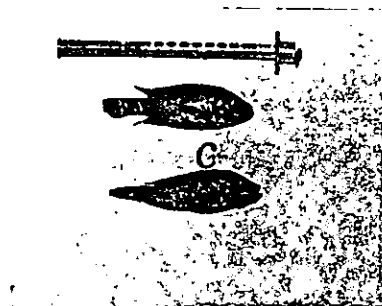


figura 4 (a, b, c, d.). Signos clínicos del *Vibrio fluorens* en las Tilapia *Oreochromis mossambicus*. Presentando a) hemorragias en piel, b) hemorragias en opérculos, c) hemorragias en aletas d) y exoftalmia.

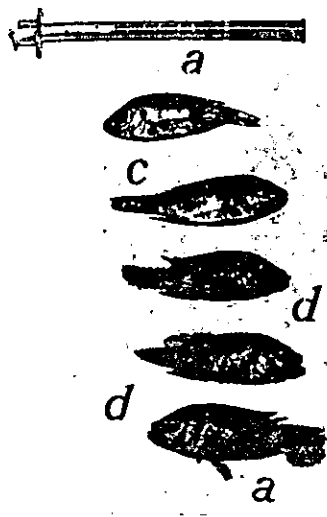


figura .4 (b). Signos que presenta la tilapia al ser infectada con *Vibrio fluorens*

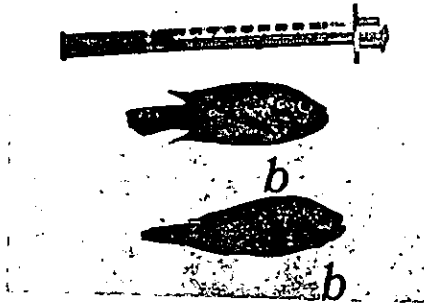


figura 4. (c). Tilapia *Oreochromis mossambicus* infectada con *Vibrio fluorens*.

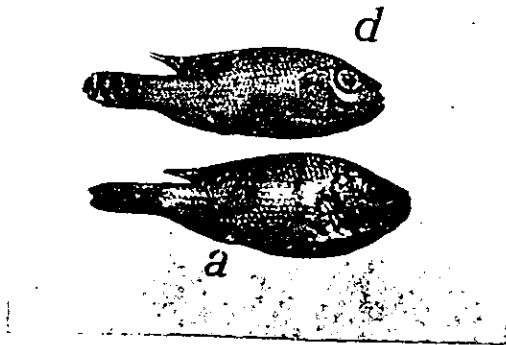


figura 4. (d). Signos que se presentan en tilapia debido a la infección del *Vibrio fluorens*

VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

Los resultados obtenidos en este experimento fue una mortalidad menor en organismos medicados en el alimento que los organismos en los cuales el medicamento fue introducido directamente en el agua

Para sustentar estos resultados estadísticamente se realizó un modelo lineal múltiple para obtener las pendientes de las dosis a estudiar para poder probar la hipótesis entre la diferencia de las pendientes de los grupos. Para esto se realizó una prueba de "t" en la cual se obtuvo que se aceptó la hipótesis alternativa que dice: las pendientes de las mortalidades de los grupos son distintas entre si con una probabilidad de 0.000 y una confiabilidad del 95% (Liman, 1993). En la figura 4 se muestra la comparación de las pendientes. para afirmar aún más la prueba anterior.

Esto quiere decir que la actividad de las concentraciones del medicamento son diferentes entre si, debido a esto se requiere una mayor concentración del medicamento en el agua para que haya menos mortalidad en este grupo.

Debido a esto el dato que se obtuvo de mortalidad en los dos tipos de bioensayos (medicamento en el alimento y el medicamento directo en el agua) es un dato importante para este estudio ya que era uno de los objetivos , pero puede haber algunas variaciones si se realizara el mismo ensayo otra vez, una de las causas sería por la patogenicidad del microorganismos que se inocula ya que se va haciendo más resistentes cada vez que se resiembran, por la sensibilidad de los organismos al patógeno, y principalmente por el daño que el *Vibrio* pueda ocasionar en los órganos internos siendo mayor que los presentados en este estudio y fuera una causa para que no hubiera asimilación del medicamento.

Los resultados obtenidos se compararon con resultados de investigaciones recientes donde se utilizó enrofloxacin (fluoroquinolona) uno de los componentes de la cefalosporina, ya que para cefalosporinas no hay investigaciones realizadas en organismos acuáticos, esto resultados fueron comparados con datos recientes de investigaciones realizadas en organismos acuáticos diferentes al del estudio, inoculados con diferentes patógenos pero con dosis del medicamento y concentración bacteriana iguales a las de este bioensayo.

El cuadro 1 muestra la mortalidad obtenida del experimento, la cual fue menor al ser comparada con los otros dos trabajos realizados con organismos acuáticos. (Paul, 1994; Hui, 1994).

Las lesiones externas son prueba de que el agente esta afectando los órganos externos e internos y son comparables con las descritas en la bibliografía.

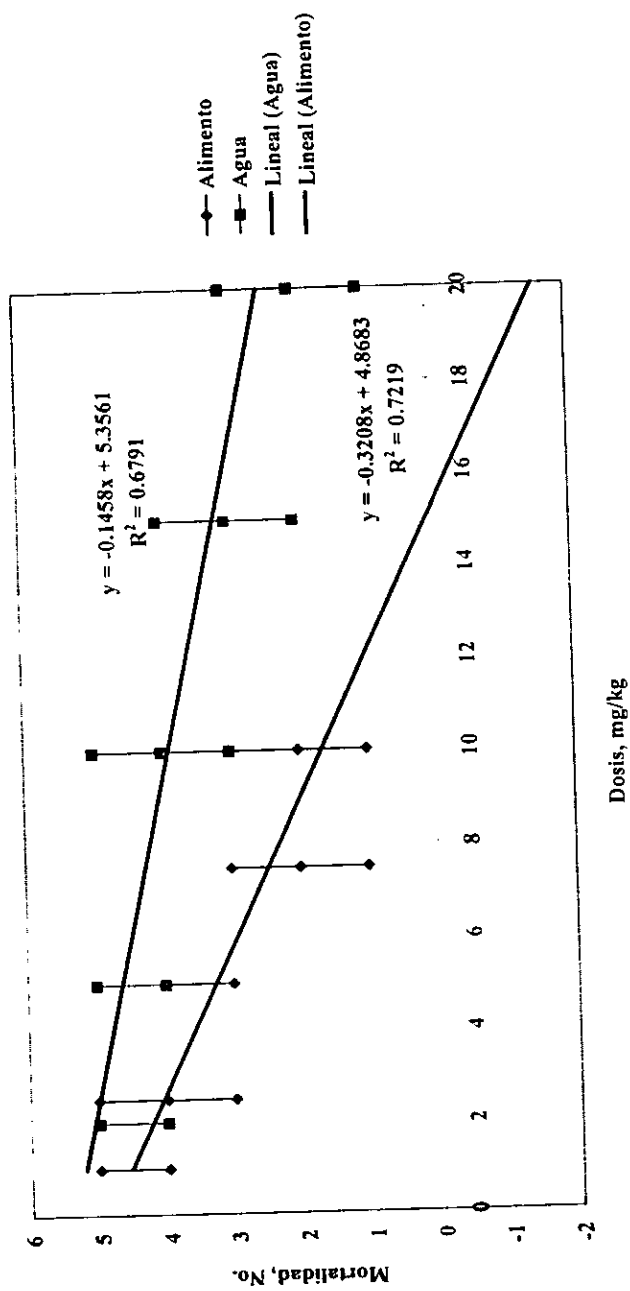


Figura 4. Comparación de las pendientes en la mortalidad de tilapia *mossambicus* expuestas a *Vibrio fluorens* y medicadas con CQEPCA 406Ls.

ORGANISMOS	MICROORGANISMOS	ANTIBIÓTICOS	DOSIS	MORTALIDAD %
TRUCHA ARCOIRIS <i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>	ENROFLOXACINA	2.5 mg/Kg 5.0 mg/Kg 10.0 mg/Kg	85 % 92 %- 97 % (Paul, 1994)
SALMON DEL ATLÁNTICO <i>Salmo salar</i>	<i>Renibacterium salmoninarum</i>	ENROFLOXACINA	2.5 mg/Kg 5.0 mg/Kg 10.0 mg/Kg	83 % 77 % 97 % (Hui, 1994)
TILAPIA <i>Oreochromis mossambicus</i>	<i>Vibrio fluorens</i>	CEFAQUINOLONA	2.5 mg/kg 5.0 mg/Kg 10.0 mg/Kg	80 % 68 % 36 % (Garcia, 1997)

Cuadro 1. Comparación de dos trabajos realizados con enrofloxacin y con el antibiótico en estudio Cefquinolona.

VIII. CONCLUSIONES.

El *Vibrio fluorens* ataca a la tilapia *Oreochromis mossambicus* cuando se le proporciona las condiciones adecuadas, temperatura 21° C y aireación constante.

Se determinó la efectividad de la cefaquinilona (CQEPCA 406 L (s)) evitando la mortalidad del total de los organismos estudiados (250).

Se encontró que la concentración óptima del medicamento para evitar la mortalidad de los organismos (alimento 6.85 mg/Kg, y en el agua de 20.52 mg/Kg).

La mejor forma de aplicación del antibiótico fue en el alimento.

El medicamento en el alimento es de 1.8634 más efectivo que el medicamento en el agua.

IX. SUGERENCIAS

Debido a la importancia que reviste en nuestros tiempos la acuicultura como una alternativa de producción de proteína animal para la población, es importante ser muy cuidadoso en el manejo de los organismos con los cuales se trabaja.

En una producción de organismos acuáticos es importante (peces) seleccionar perfectamente a los organismos con los que se va a trabajar y observar que los organismos a simple vista se vea la piel brillante, que no tenga laceraciones en la piel, y que estén completos.

Los organismos que ingresan a una granja antes de ser introducidos a los estanques con los peces ya existentes tienen que ser puestos en cuarentena y estarlos observando para que no tenga ninguna enfermedad.

Que en los estanques este controlada la biomasa de los organismos para que no se provoquen ellos mismos heridas y con esto la introducción de alguna bacteria o parásito oportunista que existen en el medio.

Realizar cortes histológicos para observar la alteración de estos producidos por *Vibrio fluorens* para poder tener conocimiento de este patógeno por si llega aparecer otra vez.

Realizar pruebas de toxicidad para poder proponer este medicamento como alternativa terapéutica.

VIII. CONCLUSIONES.

El *Vibrio fluorens* ataca a la tilapia *Oreochromis mossambicus* cuando se le proporciona las condiciones adecuadas, temperatura 21° C y aireación constante.

Se determinó la efectividad de la cefaquinilona (CQEPCA 406 L (s)) evitando la mortalidad del total de los organismos estudiados (250).

Se encontró que la concentración óptima del medicamento para evitar la mortalidad de los organismos (alimento 6.85 mg/Kg, y en el agua de 20.52 mg/Kg).

La mejor forma de aplicación del antibiótico fue en el alimento.

El medicamento en el alimento es de 1.8634 más efectivo que el medicamento en el agua.

IX. SUGERENCIAS

Debido a la importancia que reviste en nuestros tiempos la acuicultura como una alternativa de producción de proteína animal para la población, es importante ser muy cuidadoso en el manejo de los organismos con los cuales se trabaja.

En una producción de organismos acuáticos es importante (peces) seleccionar perfectamente a los organismos con los que se va a trabajar y observar que los organismos a simple vista se vea la piel brillante, que no tenga laceraciones en la piel, y que estén completos.

Los organismos que ingresan a una granja antes de ser introducidos a los estanques con los peces ya existentes tienen que ser puestos en cuarentena y estarlos observando para que no tenga ninguna enfermedad.

Que en los estanques este controlada la biomasa de los organismos para que no se provoquen ellos mismos heridas y con esto la introducción de alguna bacteria o parásito oportunista que existen en el medio.

Realizar cortes histológicos para observar la alteración de estos producidos por *Vibrio fluorens* para poder tener conocimiento de este patógeno por si llega aparecer otra vez.

Realizar pruebas de toxicidad para poder proponer este medicamento como alternativa terapéutica.

X ANEXO

1.- El agar bacteriológico se realizó de la siguiente manera

3.7 gr de BHI (caldo infusión de cerebro corazón).

1.5 gr de agar bacteriológico.

100 ml de agua destilada.

Preparación:

Todo el material se homogeneizó en una mezcladora Corning Stirrer pc-353 durante 3 minutos. Se calentó en una estufa Corning Hot Plate pc-100 hasta que se deshizo el agar bacteriológico (solución cristalina).

Se esterilizó la solución en un autoclave durante 15 minutos, se dejó enfriar.

Se vertió a cajas petri esterilizadas, dejándose 24 hrs para que hubiera crecimiento bacteriano en una incubadora a 25°C.

2.- Preparación de BHI (infusión de cerebro corazón) líquido.

7.4 ml de (BHI) en 200 ml de agua destilada

se colocó en un agitador Corning Stirrer pc- 353 por 3 minutos hasta que quedó homogéneo se vertió 50 ml de la solución en frascos viales de 60 ml de volumen haciendo 4 replicas se tapó con tapones parainyectables y con anillos metálicos se cerraron perfectamente con un sellador y se esterilizó la solución durante 15 minutos se dejó enfriar después se inoculó con una asada de bacterias por frasco dejándose en incubación durante 48 hrs a 25 °C.

3.- Preparación de la solución salina para las diluciones.

8.5 gr de NaCl en un litro de agua destilada se mezcló y se homogeneizó con una mezcladora quedando a un pH de 7 . Se tomaron 9 ml de la solución en 6 tubos de ensayo se cerraron con tapones de rosca esterilizándose durante 15 minutos y se dejó enfriar para inocular.

4.- Peso de los organismos

Organismos tratados con el medicamento incorporado en el alimento

1.0 mg/Kg	2.5 mg/Kg	5.0 mg/Kg	7.5mg/Kg	10mg/Kg
10.1	10.2	10.1	10.1	10.3
10.2	10.5	10.3	10.3	10.2
10.5	10.6	10.4	10.4	10.1
9.8	10.1	10.3	10.1	10.2
10.7	10.4	10.2	10.3	10.4
10.8	9.9	10.4	10.2	10.5
10.9	10.1	10.4	10.3	10.1
10.5	10.5	10.0	9.9	9.8
11.1	10.7	10.1	9.8	10.4
10.3	10.8	10.4	10.1	10.5
10.3	10.9	10.1	10.2	10.8
10.4	10.5	10.3	10.4	10.5
10.5	10.4	10.5	10.3	10.5
10.1	10.3	10.0	10.1	10.3
10.2	10.1	10.1	10.5	10.1
10.3	10.2	10.3	10.6	10.6
10.4	10.3	10.6	10.1	10.0
10.5	10.3	10.2	10.4	10.8
10.3	10.2	10.5	10.6	10.5
10.2	10.3	10.7	10.7	10.4
10.8	10.5	10.2	10.8	10.3
10.7	10.6	10.0	10.4	10.5
10.1	10.6	10.1	10.5	10.6
10.3	10.3	10.4	10.1	10.2
10.4	10.7	10.6	10.7	10.1

Organismos tratados con el medicamento incorporado en el agua

2.0 mg/Kg	5.0 mg/Kg	10 mg/Kg	15 mg/Kg	20 mg/Kg
10.6	10.2	10.4	10.3	10.9
10.3	10.3	10.5	10.4	11.0
10.2	10.1	10.1	10.2	11.0
10.4	10.2	10.2	10.1	10.1
10.5	10.3	9.9	10.3	10.4
10.3	10.4	10.3	10.2	10.5
10.2	10.5	10.4	10.5	10.2
10.4	10.4	10.1	10.3	10.3
10.5	10.1	10.3	10.3	10.4
10.8	10.1	10.6	10.7	10.2
10.4	10.1	10.1	10.8	11.0
10.5	10.3	10.2	10.4	10.6
10.3	10.4	10.3	10.3	10.6
10.2	10.5	10.4	10.2	11.0
10.1	10.3	10.9	10.5	10.6
10.3	10.3	10.3	10.2	10.4
10.4	10.0	9.9	10.4	10.3
10.5	10.7	10.8	10.3	10.5
10.3	10.5	10.7	10.6	10.6
10.4	10.4	10.1	10.4	10.2
10.3	10.3	10.3	10.5	10.3
10.3	10.4	10.4	10.2	10.1
10.2	10.3	10.6	10.3	10.3
10.1	10.3	10.4	10.4	10.4
10.3	10.4	10.2	10.8	10.3

5.-Preparación del alimento:

INGREDIENTES	1 KILO	250 g
Harina de carne 5%	50 gr	12.5 gr
Harina de pescado 25%	25 gr	62.5 gr
Harina de trigo 45%	450 gr	112.5 gr
Pasta de soya 20%	200 gr	50 gr
Pasta de girasol 5%	50 gr	12.5 gr
Minerales	0.5 gr	0.125 gr
Vitaminas	2.0 gr	0.5 gr
aglutinante	3.5 gr	0.875 gr

Se homogeneizan todos los ingredientes y se le agrega poco a poco agua tibia hasta formar una mezcla consistente (masa). se extiende en un plástico y con un rodillo se aplasta hasta que quede una tortilla dejándose secar durante 36 hrs.

6.- Incorporar del medicamento en el alimento

D: Dosis necesaria por el animal : mg / Kg : ppm

A: Cantidad requerida de alimento : gr / días / pez.

C: Concentración de la muestra de alimento y medicamento mg / gr de alimento.

Peso del pez: Kg.

$$D = AC / P = \text{mg} / \text{Kg}.$$

$$P = AC / D = \text{Kg}.$$

$$A = DP / C = \text{g alim} / \text{pez} / \text{días}.$$

$$C = DP / A = \text{mg} / \text{g de alimento}.$$

PESO (gr)	DOSIS mg/Kg	ALIMENTO* (gr)	MEDICAMENTO
10.0	1.0	0.5	1mg/50gr de alimento
10.0	2.5	0.5	2.5 mg/50gr
10.0	5.0	0.5	5.0 mg/50gr
10.0	5.0	0.5	7.5 mg/50gr
10.0	5.0	0.5	10.0 mg/50gr

* Se multiplica por 25 peces y por 4 días del tratamiento

[] ALIMENTO CON EL MEDICAMENTO

ppm 20 50 100 150 200

C(mg/g) 0.02 0.05 0.1 0.15 0.2

0.5	0.5	0.75	1.0	0.5	0.75	1.0	0.5	0.75	1.0	0.5	0.75	1.0
10	1.0	1.5	2.0	2.5	3.75	5.0	7.5	10	7.5	11.2	15	20
15	0.67	1.0	1.33	1.67	2.5	3.32	3.35	5.0	6.65	5.02	7.5	9.97
20	0.5	0.75	1.0	1.25	1.87	2.5	2.5	3.75	5	3.75	5.62	7.5

DOSIS

Tabla 1 Muestra las diferentes concentraciones de medicamento experimentales en mg/Kg que se mezclaron con el alimento.

7.- Incorporación del medicamento en el agua.

DOSIS mg/Kg.	VOL. : LITROS	PPM	DOSIS EN AGUA
2.0	2	10	20 μ g
5.0	2	25	50 μ g
10	2	50	100 μ g
15	2	75	150 μ g
20	2	100	200 μ g

Se pesaron 10 mg del medicamento **CQEPCA - 406 S** (1).

Se disolvieron en 10 ml de agua destilada (Reverte 1982, Frey 1995).

Tomándose de esta solución con una micropipeta las siguientes cantidades

$$20 \mu\text{l} = 20 \mu\text{g}$$

$$50 \mu\text{l} = 50 \mu\text{g}$$

$$100 \mu\text{l} = 100 \mu\text{g}$$

$$150 \mu\text{l} = 150 \mu\text{g}$$

$$200 \mu\text{l} = 200 \mu\text{g}$$

Proporcionando esta dosis diariamente durante 4 días a la misma hora.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmed- SM : Shoreit- AAM; ***Vibriosis in Tilapia species at Assiut Governorate (Egypt); Department of Animal Medicine; Faculty of Veterinary Medicine, Assiut-Veterinary- Medical- Journal. Assiut University. Assiut, Egypt. 31 : 61, 226 - 237 (1994).***

Analytical Profile, **Sistem api 20 E.** ed, Sherwood Medical. New Yorck (1986).

Apha (1989) **Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater.** Edition Seventeenth. American Public Health Association 1015 Eighteenth Street NW. Washington.

Austin. B; Stobie. M; ***Vibrio alginolyticus; the cause of gill disease leading to progressively low level mortalities among juvenile turbot *Scophthalmus maximus L*, in a scottish aquarium.*** Journal-of fish-diseases. Division de aquaculture, Department of Biological Sciences, Heriot-Watt. University; Ricarton, Edinburgh Eh 144 AS, UK. 16: 3, 227 - 280 (1993).

Barnes. A. C; Amyes. S. G. B: **Fluoroquinilones display rapid bactericidal activity and low mutation frequencies against *Aeromona salmonicida*.** Journal of Fish Diseases. 14: 6, 661-667 (1991).

Baron, E.J and Finegold S.M. (1990) **Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology.** eighth, de. The C.V. Mosby Company. USA.

Beishir, L. (1977). **Microbiology in practice.** 2 th edition. Canfield Press. pp 342

Brander. C.G., Pugh M.D., Bywater, J.R. Jenkins, W.L. (1991) **Veterinary Applied, Pharmacology and Therapeutics.** fifth ed. Ed Bailliere Tindall. London

Boot .H.N. Mc Donald E.L. (1991) **Veterinary Pharmacology and Therapeutics.** Second printing. Ed University Press. USA.

Bowser. P.R; House, M: **In vitro sensitivity of some fish pathogens to the quinolones naladixic acid and oxalinic acid and the fluoroquinolone enrofloxacin.** Bulletin of the European Association of fish pathologists; 10: 2, 48-49 (1990).

Corpi. C. M.A. et al. (1995). **Desarrollo de una nueva generación de antimicrobianos (Cefaquinolona) de diseño nacional.** Premio CrioFarma.

Cruickshank R. et al. (1975) **Medical Microbiology.** edit. Churchill Livingstone, Edition Twelfth. London and New York.

Elston, R. ; Drum, A.S.; Bunnell, P.R: **Efficacy of orally administered difloxacin for the treatment of furunculosis in Atlantic salmon held in seawater.** Journal of Aquatic Animal Health. 7: 1, 22-28 (1995).

Espinosa. J.M. Labarta V. (1988). Patología en Acuicultura . Plan de Formación de Técnicos Superiores. Programa Especial de Y + D de Acuicultura. Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica. ed. Barjan J.L. Estevez T.A. **Enfermedades Bacterianas en Peces**. Universidad de Santiago de Compostela. España pp 474- 482.

Fernández. A.I.G; Rodríguez.L.A; Nieto. T.P; **Survial of Bacterial fish pathogens in sea water**. Journal of Aquaculture. 2:3, 271-276 (1992).

Frey.R.P. (1995). **Problemas de Química y como resolverlos**. ed C.E.C.S.A. México D.F. pp 213- 228

Goth. C.W; (1990) **Farmacología Clínica**. 12ª edición. Ed Panamericana. México.D.F. pp 517-521.

Goodman G.A. (1986). **Las bases farmacológicas de la terapéutica**. 7ª edición. de Panamericana, Bogotá. pp 1085-1091.

Hastings.T.S.; Ellis.A: **Detection of antibodies induced in rainbow trout by different *Aeromona salmonicida* vaccine preparation**. Journal of Aquatic Animal Health. 2: 2, 135-140 (1990).

Hui. M.H; Gregory. A.W. and Bowse.R.P; **Efficacy of enrofloxacin for the treatment of salmonids with bacterial kidney disease, caused by *Renibacterium salmoninarum***. Departament of Avian and Aquatic Animal Medicine College of Veterinary Medicine, Cornell University Ithaca, New York. Journal of Aquatic Animal Health. 6. 220- 223 (1994).

Inglis.V; Richards. P.R: **The *in vitro* susceptibility of *Aeromona salmonicida* and other fish-pathogenic bacteria to 29 antimicrobial agents**. Journal of Fish Diseases. 14: 6, 641-650 (1991).

Jawetz.E. (1990). **Microbiología Medica**. ed 13a. de El Manual Moderno, S.A. de C.V. México D.F. pp 125

Jeney.G. ; Anderson.D.F: **Enhanced immune response and protection in rainbow trout to *Aeromonas salmonicida* bacterium following prior immersion in immunostimulants**. Fish and Shellfish Immunology. 3: 1, 51-58 (1993).

Kalant.H. (1989) **Principles of medical pharmacology**. Edition Fifth. Department of pharmacology University of Toronto Faculty of Medicine. Toronto; Ontario. Philadelphia.

Killie.J.E.A.; Jorgensen. T.O: **Immunoregulation in fish I: intramolecular-induced supresión of antibody responses to haptenedated protein antigens studied in Atlantic salmon (*Salmon salar L.*)**. Developmental and Comparative-Immunology. 18: 2, 123-136 (1994).

- Larse.J.L; Pedersen. K; Dalsgaard. Y; ***Vibrio anguillarum* serovars associated with vibriosis in vitro.** Department of Veterinary Microbiology, Royal Veterinary and Agricultural University, DK- 1870, Frederiksberg Denmark. Journal of Fish Diseases. 17:3, 259-267 (1995).
- Lewis.C.S.; Hastings T.S: ***In vitro* activities of oxolonic acid, ciprofloxacin and norfloxacin against *Aeromona salmonicida*.** Journal of Fish Diseases. 13: 5, 377-384 (1990).
- Liman.O.R. (1993). **An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis.** Edition Fourth.
- Markwardt.N.M.; Klontz.G.W: **A method to eliminate the asymptomatic carrier state of *Aeromona salmonicida* in salmonids.** Journal of Fish Diseases. 12: 4, 317-322 (1989).
- McNeill. S.J. (1979) **Sea Microbes.** University Press oxford. New York.
- Morales, A. (1974). **El Cultivo de Tilapia en México: Datos Biológicos.** Instituto Nacional de Pesca. IPN/ SI : 124. México, pp 52
- Paul.R.B; Gregory.A.W and Hui.M.H. **Laboratory efficacy of enrofloxacin for the control of *Aeromona salmonicida* infection in rainbow trout.** Department of Avian and Aquatic Animal Medicine, College of Veterinary Medicine Cornell University, Ithaca, New York. Journal of Aquatic Animal Health 6: 288-291 (1994).
- Perez.S.L.A. (1989). **Enfermedades de Importancia en Piscicultura comercial.** U.N.A.M. Méx. D.F.
- Reichenbach, H.H. (1982). **Enfermedades de los peces.** Ed. Acribia. España.
- Roberts.J.R. (1982) **Microbial Diseases of fish.** Ed,Academic Press. New York.
- Roberts. J. R. (1989). **Patología de los peces.** Ediciones MundiPrensa. Madrid. Secretaría de Pesca. Piscicultura de agua dulce. (Bagre-Carpa-Tilapia-Trucha). 1986.
- Sakai- M; Yoshida- T. **Enhancement of resistance to vibriosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (walbaum), by oral administration of *Clostridium butyricum* bacteria.** Journal-of- Fish- Diseases. Faculty of Agriculture. Miyazaki University. Miyazaki Japan. 18 : 2, 187-19 (1995).
- Stoffregen,D. A.; Chako.A.J: **Successful of furunculosis in Atlantic salmon, salmon salar L.; using the fluoroquinolone antimicrobial agent enrofloxacin.** Journal of Fish Diseases. 16: 3, 219-228. (1993).
- Willis.J.C. (1982). **Resolución de Problemas de Química General.** ed Reverte. México D.F. pp 29-46