

# Capacidad de *Vibrio fluvialis* (Lee, 1981) para producir infección en pez dorado (*Carassius auratus*, L.)

## Capacity of *Vibrio fluvialis* (Lee, 1981) to produce disease in goldfish (*Carassius auratus*, L.)

Pilar Negrete Redondo\*  
Jorge Romero Jarero\*\*  
José Luis Arredondo Figueroa\*\*\*

---

### Abstract

Specimens of *Carassius auratus* were injected intramuscularly with different infective doses of *Vibrio fluvialis* to prove the capacity of this pathogen for generating diseases in aquatic organisms, as well as to establish the corresponding LD<sub>50</sub> and to know whether these bacteria have the capacity to infect the cultivated fish through water from ponds, or if a live host is needed to produce infection. The etiological relationship between *V. fluvialis* and its host was established. Concurrently, the clinical forms of this infection were characterized as archetypical response, i.e. focal dermomyonecrosis concomitant with acute bacterial septicemia. The signs and lesions were a particular feature of vibriosis and furunculosis. This pathogen was unable to generate disease when the infection was experimentally induced through water from aquaria.

**Keys words:** BACTERIAL INFECTION, EXPERIMENTAL TRANSMISSION, ORNAMENTAL FISH, *VIBRIO FLUVIALIS*, *CARASSIUS AURATUS*.

### Resumen

A algunos peces de ornato de la especie *Carassius auratus* se les inyectó, vía intramuscular, diferentes dosis infectivas de la bacteria *Vibrio fluvialis* con el fin de probar la capacidad de ésta para producir infección en organismos acuáticos, establecer su correspondiente DL<sub>50</sub> y determinar si esta bacteria puede infectar los individuos cultivados a través del agua de los estanques de cultivo, o si necesita de un hospedero vivo para transmitir y producir infección. Se estableció la relación etiológica entre *Vibrio fluvialis* y su huésped, el cuadro clínico obtenido fue caracterizado como respuesta arquetípica parecida a una dermomyonecrosis ulcerativa con septicemia aguda. Los signos y lesiones fueron característicos de vibriosis y furunculosis. Se comprobó que esta especie bacteriana no posee la capacidad de ser transmitida vía el agua de los acuarios.

**Palabras clave:** INFECCIÓN BACTERIANA, TRANSMISIÓN EXPERIMENTAL, PECES DE ORNATO, *VIBRIO FLUVIALIS*, *CARASSIUS AURATUS*.

---

Recibido el 27 de febrero de 2003 y aceptado el 30 de septiembre de 2003.

\* Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calz. del Hueso 1 100, Col. Villa Quietud, México, D. F.

\*\* Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

\*\*\* Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, 09340, México, D.F.

## Introduction

Many species of Gram (-) bacteria had been confirmed experimentally as pathogens of aquatic organisms, some as strict and others as opportunistic pathogens. For example: *Aeromonas salmonicida*,<sup>1</sup> *Pseudomonas chlororaphis*,<sup>2</sup> *Yersinia ruckeri*,<sup>3</sup> *Vibrio anguillarum*,<sup>4</sup> *Aeromonas salmonicida* subsp *masoucida*,<sup>5</sup> *Flexibacter columnaris*,<sup>6</sup> *Photobacterium damsela* subsp *piscicida*,<sup>7</sup> *Pseudomonas anguilliseptica*,<sup>8</sup> *Edwardsiella tarda*,<sup>9</sup> *Aeromonas salmonicida* subsp *achromogenes*,<sup>10</sup> *Aeromonas hydrophila*,<sup>11</sup> *Edwardsiella ictaluri*,<sup>12</sup> *Photobacterium damsela* subsp *damsela*,<sup>13</sup> *Vibrio ordalii*,<sup>14</sup> and *Vibrio salmonicida*.<sup>15</sup> However, due to organic and inorganic pollution from urban and farming waste discharged and carried by water currents that supply fish ponds, the bacteriological quality of water has been decreasing.

Many bacteria of etiological unknown relationship with their host have been isolated from fish kidneys. *Vibrio fluvialis* has been isolated from different environments throughout the world, from human patients with diarrhea,<sup>16</sup> but, to date no scientific information is available on experimentally testing it as pathogenic for cultivated fish. This bacterium has been isolated at the same time and in the same place together with other bacteria already accepted as pathogenic for aquatic organisms<sup>17</sup>. Hence, in the case of disease infection outbreaks, the effect of these bacteria on cultivated organisms is unknown.

Based on the above, it is necessary to experimentally test the actual capacity of *Vibrio fluvialis* to produce diseases in healthy organisms. With this objective we inoculated fish with the bacterium and followed Koch's postulate,<sup>18</sup> and aimed our work at establishing the corresponding LD<sub>50</sub>, testing concurrently whether the water of fish ponds can be a carrier of *V. fluvialis* and affect cultivated fish.

## Materials and methods

A fish farm with a disease outbreak from bacterial infection in *Carassius auratus* fish was visited to obtain samples of *Vibrio fluvialis*. Fish with lesions and signs of diseases<sup>19-21</sup> were observed and data recorded, as well as sanitary management and some important physical and chemical parameters, temperature, dissolved oxygen (OD) and nitrite (NO<sub>2</sub>) and nitrate (NO<sub>3</sub>), to know whether this bacterium was an opportunistic pathogen and to establish the critical points of the sanitary condition of production, based on the corresponding Official Mexican Standard<sup>22</sup> for fish farms.<sup>23</sup>

The diseased fish, with general signs and lesions of bacterial infection, were taken out with a net scoop. The fish were anesthetized with tricaine methane sulfonate (0.1 g/L) and after 5 min euthanasia was practiced. After dissection, samples were obtained from kidney<sup>19,20</sup> with a bacteriological loop, under sterile conditions, and streaked onto plates with Thiosulfate-

## Introducción

Muchas especies de bacterias gramnegativas han sido experimentalmente confirmadas como patógenos de organismos acuáticos, algunas como patógenos estrictos y otras como oportunistas; por ejemplo, *Aeromonas salmonicida*,<sup>1</sup> *Pseudomonas chlororaphis*,<sup>2</sup> *Yersinia ruckeri*,<sup>3</sup> *Vibrio anguillarum*,<sup>4</sup> *Aeromonas salmonicida* subsp *masoucida*,<sup>5</sup> *Flexibacter columnaris*,<sup>6</sup> *Photobacterium damsela* subsp *piscicida*,<sup>7</sup> *Pseudomonas anguilliseptica*,<sup>8</sup> *Edwardsiella tarda*,<sup>9</sup> *Aeromonas salmonicida* subsp *achromogenes*,<sup>10</sup> *Aeromonas hydrophila*,<sup>11</sup> *Edwardsiella ictaluri*,<sup>12</sup> *Photobacterium damsela*, subsp *damsela*,<sup>13</sup> *Vibrio ordalii*<sup>14</sup> y *Vibrio salmonicida*.<sup>15</sup> Sin embargo, debido a la descarga de contaminantes y desechos urbanos y rurales directamente a los flujos de agua que surten los estanques de cultivos de las granjas acuícolas, la calidad bacteriológica de ésta ha disminuido.

Se han aislado muchas bacterias directamente del riñón de peces cultivados cuya relación etiológica con el hospedero aún es desconocida; entre éstas, *Vibrio fluvialis* ha sido aislada de diferentes tipos de muestras de pacientes humanos con diarrea,<sup>16</sup> pero a la fecha no se ha registrado ningún informe científico de esta especie bacteriana como patógena de peces de ornato. Este tipo de bacteria se ha aislado al mismo tiempo con otras bacterias patógenas de organismos acuáticos;<sup>17</sup> por tanto, en el caso de una epizootia bacteriana el efecto de *V. fluvialis* sobre los organismos cultivados aún es desconocido.

Con base en lo anterior, es necesario probar experimentalmente la capacidad de *V. fluvialis* para infectar organismos acuáticos sanos. Además, para establecer la correspondiente DL<sub>50</sub> para esta bacteria se inoculó a los peces experimentales con diferentes dosis infectivas de la bacteria problema; con ese propósito durante todo el proceso experimental se siguieron los postulados de Koch.<sup>18</sup> Asimismo, se consideró probar la capacidad del agua de los estanques como viable vía de contagio o bien si requiere de una forma indispensable del hospedero vivo para transmitir la infección.

## Material y métodos

Durante el proceso de epizootia fue visitada una granja piscícola, con objeto de obtener la bacteria *V. fluvialis*. Se identificaron peces de ornato de la especie *Carassius auratus* que mostraban signos y lesiones de infección.<sup>19-21</sup> También se efectuó la prospección del manejo sanitario de las granjas para establecer puntos críticos de las condiciones sanitarias de producción, con base en las Normas Sanitarias Oficiales Mexicanas para granjas acuícolas. También se consideraron algunos parámetros físicos y químicos (temperatura y oxígeno disuelto) (OD), para saber si esta bacteria es un patógeno oportunista.<sup>22,23</sup>

Los individuos que mostraban signos y lesiones de infección fueron sustraídos de los estanques de

**Cuadro 1**  
**GRUPO TESTIGO DE PECES *Carassius auratus* INOCULADOS CON SOLUCIÓN SALINA ESTÉRIL.**  
**CARACTERIZACIÓN DIAGNÓSTICA**

CONTROL BATCH OF *Carassius auratus* FISH INOCULATED WITH STERILE SALINE SOLUTION

Characteristic	Fish 1	Fish 2	Fish 3	Fish 4	Fish 5	Fish 6	Fish 7	Fish 8	Fish 9	Fish 10
Color	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Skin	Edema	Edema	Edema	Edema	Edema	Edema	Edema	Edema	Edema	Edema
Scales	Bristle	Bristle	Bristle	Bristle	Bristle	Bristle	Bristle	Bristle	Bristle	Bristle
Fins and tail	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Mouth	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Branchia	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Eyes	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Body	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Appetite	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia
Behavior	Nervous	Nervous	Nervous	Nervous	Nervous	Nervous	Nervous	Nervous	Nervous	Nervous
Feces	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Swimming	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Secretions	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

\*No signs were

Citrate-Bile Salts-Sucrose agar (TCBS), and incubated for 24 h at room temperature. The next day the samples were purified and Gram stained. Cellular morphology was observed using an optical microscope and the microorganisms were identified using API-20 and API-20NE.<sup>24,25</sup> Complementary biochemical identification tests were carried out.<sup>16,26-30</sup>

To select only healthy fish, without disease signs or lesions, 60 fish in an aquarium were observed for a week. To know whether the experimental fish had had previous contact with *Vibrio fluvialis*, their immunoglobulin titer was established by collecting 2 mL of blood, which were centrifuged and then agglutination reactions were performed, using the parallel dilution techniques.<sup>31</sup>

The inoculum was prepared sowing the bacterial strain three times in 50 mL of Brain Heart Infusion (BHI) broth with a metered bacteriological loop. The mixture was incubated in a water bath, under gentle agitation at room temperature for 24 h.

The next day, dilutions from  $10^7$  to  $10^3$  were made,<sup>32</sup> to stabilize the amount of colony forming units (CFU), and to have concentrations of inocula to set the lethal dose (LD<sub>50</sub>) and prove the virulence of the strain.

6 aquaria were prepared with 10 fish each. One aquarium was used as control, in which fish, under the same condition, were inoculated with sterile saline solution, to reproduce the stress condition induced by inoculation. Ten fish in the other five aquariums were inoculated with different concentrations of inoculum ( $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  and  $10^3$  CFU/mL) at a dose of 1 mL of inoculum/100 g of fish weight, in other words the inocula were 0.2 mL to each fish,<sup>21</sup> applied intramuscularly on the dorsal region of the fish. It is important to establish that the experimental aquariums were conditioned to the same environmental condition as the culture ponds from the fish farms, at 22°C, pH 7 and OD 5 mg/mL and 0.3 ppm of nitrite and nitrate.

Afterwards, signs, lesions and behavior changes in both groups were recorded each hour until the fish died.

The number of dead fish was plotted on Probit paper to define LD<sub>50</sub>.<sup>33</sup> To recover the inoculated pathogens, necropsies were performed and samples were taken from the fish kidney using a bacteriological loop which was streaked over TCBS agar, and then incubated for 24 h at room temperature. These samples were purified, Gram stained to recover only the Gram (-) strain, and identification was achieved with the same technique previously described.

To know whether the survivor fish had formed defenses against the inoculated bacteria, the agglutination reactions were repeated, using the parallel dilution technique.<sup>31</sup>

For the second phase of the experiment, aimed at knowing whether *V. fluvialis* can survive in the water and induce diseases, a new group of ten healthy fish of the same species was introduced into the same six

cultivo con una red de cuchara. Los peces fueron anestesiados con sulfometano de tricafina (0.1 g/L), después de cinco minutos se practicó la eutanasia. Después de la disección, se extrajeron con un asa bacteriológica estéril, muestras del riñón de los peces<sup>19,20</sup> y fueron sembradas sobre placas de agar de tiosulfato-citrato-sales biliares-sucrosa (TCBS) y se incubaron durante 24 h a temperatura ambiente. Al día siguiente las colonias fueron purificadas y se efectuó la tinción de gram. Se observó y registró la morfología celular usando un microscopio óptico. Por último, los microorganismos fueron identificados usando galerías comerciales API-20E y API-20NE.<sup>24,25</sup> Se efectuaron pruebas complementarias de identificación.<sup>16,26-30</sup>

Para seleccionar únicamente peces sanos, sin evidencia de signos ni lesiones de infección, 60 individuos sanos de la especie *C. auratus* fueron observados en una tina de cultivo durante ocho días. Con el propósito de establecer si ese lote había tenido previo contacto con *V. fluvialis*, se efectuó la titulación de inmunoglobulinas de una submuestra, para ello se extrajeron y centrifugaron 2 mL de suero sanguíneo de los peces, la reacción de aglutinación se efectuó usando la técnica de dilución paralela.<sup>31</sup> El inóculo fue preparado sembrando tres asadas del cultivo puro de *V. fluvialis* en 50 mL de caldo de infusión cerebro-corazón (BHI) con un asa bacteriológica calibrada estéril. La mezcla fue incubada a baño María con agitación a temperatura ambiente durante 24 h.

Al día siguiente se efectuaron diluciones desde  $10^7$  hasta  $10^3$  unidades formadoras de colonia por mililitro (ufc/mL),<sup>32</sup> para establecer concentración de ufc/mL de cada una de las diferentes dosis infectivas de inóculos con las que se establecerá la DL<sub>50</sub>.

Se prepararon seis acuarios con diez individuos en cada uno, disponiéndose de la siguiente forma: Un acuario fue usado como testigo, ahí se inyectó a diez peces con solución salina estéril para reproducir el estrés provocado por el efecto mecánico de la inyección; en los cinco restantes acuarios se colocaron también diez peces en cada uno, que fueron inyectados con 1 mL por cada 100 g de peso<sup>21</sup> de las diferentes dosis infectivas previamente preparadas ( $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  y  $10^3$  ufc/mL), aplicado intramuscularmente sobre la región dorsal. Es importante establecer que los acuarios experimentales fueron acondicionados en las mismas condiciones ambientales que fueron registrados en los estanques de cultivo de las granjas acuícolas: 22°C, pH 7, OD a 5 mg/mL y 0.3 ppm de nitratos y nitritos.

A partir de ese momento y hasta la muerte de los individuos, se registraron cada hora los cambios de comportamiento, signos y lesiones causados por la infección que mostraron los individuos tanto del grupo testigo como experimentales, así como de las necropsias en los casos en que los individuos murieron.

El número de individuos muertos fue graficado

Cuadro 2

CARACTERIZACIÓN DE SIGNOS Y LESIONES DE INFECCIÓN EN PECES *Carassius auratus* INOCULADOS CON 107 ufc/m.CHARACTERIZATION OF SIGNS AND LESIONS IN *Carassius auratus* FISH INOCULATED WITH 107 cfu/ML

Characteristic	DIAGNOSTIC Characterization									
	Fish 1	Fish 2	Fish 3	Fish 4	Fish 5	Fish 6	Fish 7	Fish 8	Fish 9	Fish 10
Color	*	*	*	*	*	*	Opaque	Opaque	*	Opaque
Skin	*	*	*	*	*	Edema necrosis	Edema necrosis	Edema necrosis	*	Edema necrosis
Scales	*	*	*	*	*	Desquamation	Desquamation	Desquamation	Desquamation	Desquamation
Fins and tail	Retracted	Retracted	Retracted	Retracted	Retracted	Retracted	Retracted	Retracted	Retracted	Retracted
Mouth	Gasping abnormal	Gasping abnormal	Gasping abnormal	Gasping abnormal	Gasping abnormal	Gasping abnormal	Gasping abnormal	Gasping abnormal	Gasping abnormal	Gasping abnormal
Branchia	Operculum open *	*	*	*	*	Breathing abnormal	Breathing abnormal	Breathing abnormal	*	Breathing abnormal
Eyes	Exophthalmus	Exophthalmus	Exophthalmus	Exophthalmus	Exophthalmus	Exophthalmus	Exophthalmus	Exophthalmus	Exophthalmus	Exophthalmus
Body	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen
Appetite	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia
Behavior	Immobile	Immobile	Immobile	Immobile	Immobile	Immobile	Immobile	Immobile	Immobile	Immobile
Feces	No defecation	No defecation	No defecation	No defecation	No defecation	No defecation	No defecation	No defecation	No defecation	No defecation
Swimming	Erratic	Erratic	Erratic	Erratic	Erratic	Erratic	Erratic	Erratic	Erratic	Erratic
Secretions	Mucosity	Mucosity	Mucosity	Mucosity	Mucosity	Mucosity	Mucosity	Mucosity	Mucosity	Mucosity
Mouth	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Skin	*	*	*	*	Desquamation	Desquamation	Desquamation	*	*	*
Digestive tract	Swollen	Swollen	Swollen	Swollen	Swollen	Swollen	Swollen	Swollen	Swollen	Swollen
Kidney	Destroyed	Destroyed	Destroyed, edema	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed
	Swollen	Swollen	*	*	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed
Gallbladder and spleen	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Swimming bladder	*	*	*	*	*	*	Destroyed	Destroyed	*	*
Gonads	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Muscle	Necrosis	*	*	*	Necrosis	Necrosis	Necrosis	Necrosis	*	Necrosis
Smell	*	*	*	*	*	*	*	*	Unpleasant	*

\* No signs were shown



aquaria, without changing the water. An amount of CFU/mL (50 L of water in each aquarium) of *V. fluvialis* equivalent to the amount of CFU/mL of inocula applied intramuscularly to the fish in the first experimental phase, were introduced into the water, at the following doses:  $2 \times 10^{11}$ ,  $2 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^8$  and  $3 \times 10^7$  CFU/mL.

## Results

*Vibrio fluvialis* was isolated from sick fish (*Carassius auratus*). Disease signs and lesions corresponded to a generalized bacteriosis, corresponding to a dermomyonecrosis with ulceration syndrome.<sup>34</sup>

The immunoglobulin titer revealed that the fish had had previous contact with *Vibrio fluvialis*, although the initial titers were low: 1:60 y 1:80.

Control fish, inoculated only with sterile saline solution, presented some general signs of bacterial infection: stiff scales, edema, anorexia, and nervousness. The normally behaving and healthy looking fish recovered within the next 30 h (Table 1).

The experimental groups inoculated with  $10^7$ ,  $10^6$  and  $10^5$  CFU/mL began to show signs of infection three hours after having been inoculated. Some of them changed skin color, becoming much darker or even turning red, as well as presenting corporal edema, falling or retracting scales, bloody or injured fins, abnormally fast gasping and breathing, open operculum; some fish had cloudy eyes, distended abdomen and anorexia. Some showed nervous behavior and others became immobile. In general, their behavior became abnormal compared with the control group. Only the fish inoculated with the  $10^5$  bacterial strain dose suffered diarrhea, distorted or slow swimming and marked mucus secretion. All the fish from these groups died during the next 24 h. Necropsies were immediately performed, showing very acute signs and lesions. Almost all internal organs were seriously damaged: the digestive tract was swollen, bloody or smashed, kidney and liver were smashed and muscle was also damaged, a putrid smell was perceived when the bodies were opened (Tables 2, 3 and 4).

The experimental groups inoculated with  $10^4$  and  $10^3$  CFU/mL showed signs three days after inoculation. Signs, lesions and behavior of general bacterial infection were observed: opaque color of the bodies, some had mycosis, desquamation, eroded and retracted fins and tail, and anorexia. The behavior of these fish was nervous, they swam slowly and had important mucus secretion over the body surface. Normal healthy looking fish were recovered after eight days and are still living (Tables 5 and 6).

Immunoglobulin titers in the surviving fish were increased: 1: 2 280 and 1: 2 560, indicating that they had generated defenses against the inoculated *V. fluvialis* pathogen.

In the second experimental phase only general signs of bacterial infection (darker skin, anorexia

en papel Probit, para obtener la DL<sub>50</sub>.<sup>33</sup> La recuperación del patógeno inoculado se efectuó a partir de una muestra del riñón de los individuos muertos, tomada en el momento de la necropsia. La muestra se tomó con una asa bacteriológica estéril y se sembró en placas de TCBS, que se incubaron a temperatura ambiente durante 24 h. Las colonias obtenidas ya purificadas se tiñeron con gram, todas las colonias gramnegativas fueron identificadas con las técnicas y pruebas bioquímicas antes mencionadas.

Para detectar si los individuos sobrevivientes formaron defensas contra el patógeno inoculado, la reacción de aglutinación de inmunoglobulinas fue repetida, usando nuevamente la misma técnica de dilución paralela.<sup>31</sup>

De la segunda parte del experimento dirigido para estimar si *V. fluvialis* puede sobrevivir en el agua de los estanques e inducir la enfermedad infecciosa, un grupo nuevo de diez individuos sanos experimentales de la misma especie fueron introducidos en los seis acuarios del experimento anterior y sin haber cambiado agua. Una cantidad de ufc/mL del patógeno problema, equivalente a la inoculada intramuscularmente a los peces del experimento anterior, fue introducida en los acuarios, entonces los acuarios contenían:  $2 \times 10^{11}$ ,  $2 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^8$  y  $3 \times 10^7$  ufc/mL

## Resultados

*V. fluvialis* fue aislada de los peces *Carassius auratus* enfermos sustraídos de los estanques de cultivo de las granjas piscícolas visitadas. Los signos y lesiones de enfermedad observados correspondieron a una bacteriosis generalizada, específicamente al síndrome de dermomyonecrosis con ulceraciones.<sup>34</sup>

La titulación de inmunoglobulinas efectuada previamente al experimento revela que los peces tuvieron contacto previo con esa bacteria, aunque los títulos obtenidos fueron bajos: 1:60, 1:80.

Los peces incluidos en el grupo testigo inoculados únicamente con solución salina estéril, mostraron signos y lesiones generales de bacteriosis: Escamas caedizas, edema, anorexia y se manifestaron muy nerviosos; estos signos desaparecieron a las 30 h del experimento, por lo que el estado "normal" (observado antes del experimento) de comportamiento y salud de los individuos se restableció (Cuadro 1).

Los grupos experimentales inoculados con  $10^7$ ,  $10^6$  y  $10^5$  ufc/mL iniciaron a mostrar signos de infección tres horas después de ser inoculados. Algunos mostraron cambios de coloración de la piel, en su mayoría se oscurecieron o se tornaron más rojos, presentaron edema corporal, escamas erizadas o caedizas, aletas deshinchadas o con finos filamentos sanguinolentos, respiración anormal sobre la superficie de los acuarios, rápido boqueo y apertura de opérculos, algunos peces mostraron ojos opacos y otros exoftálmicos, cuerpo hinchado y anorexia. Algunos individuos se comportaron de forma anormal en com-

Cuadro 3

CARACTERIZACIÓN DE SIGNOS Y LESIONES EN PECES *Carassius auratus* INOCULADOS CON 106 ufc/ ml  
 CARACTERIZACIÓN DIAGNÓSTICA

CHARACTERIZATION OF SIGNS AND LESIONS IN *Carassius auratus* FISH INOCULATED WITH 106 cfu/ ml

Characteristic	Fish 1	Fish 2	Fish 3	Fish 4	Fish 5	Fish 6	Fish 7	Fish 8	Fish 9	Fish 10
Color	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Skin	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Scales	Desquamation	*	Desquamation	Desquamation	Desquamation	Desquamation	*	Desquamation	Desquamation	Desquamation
Fins and tail	Eroded	Eroded	Eroded	Hemorrhage	Hemorrhage	Hemorrhage	Hemorrhage	Hemorrhage	Hemorrhage	Hemorrhage
Mouth	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Branchia	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Eyes	Exophthalmus	Exophthalmus	Exophthalmus	Exophthalmus	Exophthalmus	Exophthalmus	Exophthalmus	Exophthalmus	Exophthalmus	Exophthalmus
Body	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen
Appetite	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia
Behavior	Abnormal	Abnormal	Abnormal	Abnormal	Abnormal	Abnormal	Abnormal	Abnormal	Abnormal	Abnormal
Feces	Not observed	Not observed	Not observed	Not observed	Not observed	Not observed	Not observed	Not observed	Not observed	Not observed
Swimming	Erratic	Erratic	Erratic	Erratic	Erratic	Erratic	Erratic	Erratic	Erratic	Erratic
Secretions	Mucosity	Mucosity	*	Mucosity	Mucosity	*	Mucosity	Mucosity	*	*
<b>NECROPSIES</b>										
Mouth	Hemorrhage	*	*	*	*	*	*	*	*	Hemorrhage
Skin	Mucosity	Desquamation	Not observed	Mucosity	Mucosity	Not observed	Not observed	Not observed	Not observed	Not observed
Digestive tract	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed
Kidney	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed
Liver	Destroyed	Necrotic	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed
Gallbladder and spleen	Swollen	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Swimming bladder	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Gonads										
Muscle										
Smell	Unpleasant	Unpleasant	*	*	*	Unpleasant	Unpleasant	*	Unpleasant	*

\* No signs were shown

and retracted fins) were observed. These disappeared after ten days and no fish died.

From the different inoculum doses used and plotted using probit paper, the LD<sub>50</sub> was determined as 104.5 CFU/mL.

## Discussion

All of Koch's postulates were fulfilled, hence *V. fluvialis* must be considered as having the capacity to produce diseases in *Carassius auratus*. The presence of general signs of bacterial infection in the control group were a consequence of the mechanical shock caused by the intramuscular injection with sterile saline solution. The fish's defenses were decreased, which, in the presence of normal bacterial flora, provoked the general signs that disappeared in a very short time.

All the fish from the first three experimental groups (10<sup>7</sup>, 10<sup>6</sup> and 10<sup>5</sup> CFU/mL) showed clinical traits of general bacterial infection including erratic swimming. Their breathing at the surface of the aquariums and their opened operculums indicated damage to the bladder, branchias or to the heart. Other clinical traits included: excessive secretion of mucus over the body surface, as a defense mechanism against infection; presence of mucus in the form of large filaments in the anus area, indicating enteritis; and abnormal behavior, such as nervousness or immobility.

Bacterial septicemia was detected due to the presence of hemorrhage petequias and furunculus over the body and hemorrhage filaments on fins, tail and eyes. All the internal organs were destroyed or damaged. Other important signs were exophthalmus and swollen bodies. In an important number of cases a very bad smell was appreciated.

According to Hjeltnes and Roberts,<sup>34</sup> *V. fluvialis* can be considered a very aggressive bacterium since the generalized pathology shown by the inoculated fish can be associated to an archetypal response: the septicemia response. On the other hand, the observed clinical pathology can be associated to focal ulcerative dermomyonecrosis, concomitant with the acute bacterial septicemia. These lesions are a particular feature of vibriosis and furunculosis.

The fact of having obtained less severe signs and lesions in the experimental groups injected with 10<sup>4</sup> and 10<sup>3</sup> CFU/ml indicated that these dosages weren't enough to cause death to the fish.

Likewise, from the LD<sub>50</sub> test which was equivalent to 50 000 CFU/ml, when compared with the experimental dose used by other researchers<sup>19,20,35</sup> when experimentally inoculating another pathogen such as *Aeromonas hydrophila* (10<sup>6</sup> CFU/ml), the aggressiveness of this bacterium can be confirmed, since as little as 50,000 CFU/ml were needed to induce death in half of the experimental population,<sup>18</sup> since the virulence is inversely proportional to the amount of CFU/ml inoculated.

paración con los del grupo testigo, desarrollando nado nervioso; únicamente los peces del grupo de 10<sup>5</sup> sufrieron de diarrea, mostraron además nado desordenado o lento. En todos los peces de todos los lotes experimentales se apreció secreción exagerada de moco sobre el cuerpo. Todos los peces de estos grupos murieron durante las primeras 24 h del experimento. Inmediatamente se efectuaron las necropsias, encontrándose signos y daños agudos en todos los órganos internos de los peces, se apreció mal olor, hemorragia generalizada a todos los órganos, músculos, hígado y riñón deshecho (Cuadros 2, 3 y 4). Se recuperó *V. fluvialis* de todas las muestras de riñón de los grupos experimentales.

Los grupos experimentales inoculados con las dosis 10<sup>4</sup> y 10<sup>3</sup> ufc/mL, iniciaron a manifestar signos de infección a los tres días de ser inoculados. En este caso se identificaron signos y lesiones de bacteriosis general: El color corporal de estos individuos se oscureció en algunos casos y en otros se enrojecieron, los ojos se tornaron opacos, se detectó manifestación de micosis sobre el cuerpo de los peces, escamas caedizas en algunas zonas de los cuerpos, aletas replegadas y erosionadas, anorexia. El comportamiento se observó nervioso con nado lento, importante secreción de moco por todo el cuerpo. Después de ocho días todos los individuos de estos grupos recuperaron su inicial estado de salud, aún permanecen vivos (Cuadros 5 y 6).

La titulación de inmunoglobulinas efectuada en los peces que sobrevivieron al experimento marcó un incremento en los títulos: 1:2 280 y 1:2 560, indicando que se generaron defensas contra *V. fluvialis*.

Al graficar el número de peces muertos de cada grupo experimental en papel probit, se determinó 10<sup>4.5</sup> ufc/mL como la DL<sub>50</sub> para *V. fluvialis*.

De la segunda fase experimental solamente se registraron algunos signos leves de infección bacteriana: Oscurecimiento de la piel, anorexia, aletas retraídas, que desaparecieron después de diez días, ningún pez murió.

## Discusión

Se cumplieron todos los postulados de Koch; por tanto, *V. fluvialis* es capaz de producir infección en peces *Carassius auratus* sanos. La presencia de signos generales de bacteriosis en los peces del grupo testigo fue consecuencia del choque mecánico que implicó la inyección con solución salina estéril. Se considera que la manifestación de estos signos, que desaparecieron en un lapso muy corto, fue consecuencia de la disminución de defensas de los peces por el estrés experimental, en presencia de bacterias que forman parte de la flora normal de los peces.

El cuadro clínico acusado por los individuos de los grupos 10<sup>7</sup>, 10<sup>6</sup> y 10<sup>5</sup>, se caracterizó por la presencia de algunos signos de bacteriosis general, nado errático, respiración sobre la superficie de los acuarios y opérculos abiertos constantemente; lo indica un



Cuadro 4

CARACTERIZACIÓN DE SIGNOS Y LESIONES DE PECES DE ORNATO *Carassius auratus* INOCULADOS CON 105 ufc/mlCHARACTERIZATION OF SIGNS AND LESIONS IN *Carassius auratus* FISH INOCULATED WITH 105 cfu/ml

Characteristic	DIAGNOSTIC Characterization										
	Fish 1	Fish 2	Fish 3	Fish 4	Fish 5	Fish 6	Fish 7	Fish 8	Fish 9	Fish 10	
Color	Opaque	Opaque	*	*	*	Reddened	Reddened	Reddened	Reddened	Reddened	
Skin	Edema	Edema	*	Edema	*	Edema	Edema	Edema	Edema	*	
Scales	*	*	*	*	Desquamation	Desquamation	*	*	*	*	
Fins and tail	*	*	*	Eroded	*	*	*	*	*	*	
Mouth	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Branchia											
Eyes	Exophthalmus	Turbid	*	*	Turbid	Turbid	Turbid	Turbid	*	*	
Body	Abdomen swollen	*	*	*	*	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	*	
Appetite	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	
Behavior	Abnormal	Abnormal	Abnormal	*	Abnormal	Abnormal	Abnormal	Abnormal	Abnormal	Abnormal	
Feces	Diarrhea	Diarrhea	*	Diarrhea	Diarrhea	Diarrhea	Diarrhea	Diarrhea	Diarrhea	Diarrhea	
Swimming	Erratic	Erratic	Erratic	*	Erratic	*	*	Erratic	*	Erratic	
Secretions	Mucosity	Mucosity	*	*	*	Mucosity	Mucosity	*	Mucosity	*	
					<b>NECROPSIES</b>						
Mouth	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Skin	Desquamation	Desquamation	*	*	*	*	*	Desquamation	*	*	
Digestive tract				Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	
Kidney	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	
Liver	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	Destroyed	
Gallbladder and spleen	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Swimming bladder	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Gonads	*	*	Damaged	Damaged	*	*	*	*	*	*	
Muscle	*	*	Swollen	Reddened	*	Necrotic	Swollen	*	Swollen	Swollen	
Smell	Unpleasant	Unpleasant	Unpleasant	*	*	Unpleasant	Unpleasant	*	*	*	

\* No signs were shown

## Cuadro 5

CARACTERIZACIÓN DE SIGNOS Y LESIONES EN PECES DE ORNATO *Carassius auratus* INOCULADOS CON 104 ufc/ ml.  
 CARACTERIZACIÓN DIAGNÓSTICA

CHARACTERIZATION OF SIGNS AND LESIONS IN *Carassius auratus* FISH INOCULATED WITH 104 cfu/ ml

Characteristic	Fish 1	Fish 2	Fish 3	Fish 4	Fish 5	Fish 6	Fish 7	Fish 8	Fish 9	Fish 10
Color	Opaque	Opaque	Opaque	Opaque	Opaque	Opaque	Opaque	Opaque	Opaque	Opaque
Skin	*	*	*	Mycosis	*	*	Mycosis	*	*	*
Scales	Desquamation	Desquamation	Desquamation	Desquamation	Desquamation	Desquamation	Desquamation	Desquamation	Desquamation	Desquamation
Fins and tail	*	*	*	Eroded	*	*	Eroded	*	Retracted	Eroded
Mouth	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Branchia	Dark	*	*	*	Dark	*	*	*	*	*
Eyes	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Body	*	Abdomen swollen	Abdomen swollen	*	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen
Appetite	Anorexia	Anorexia	Anorexia	*	*	*	*	*	*	*
Behavior	Nervous	Nervous	Nervous	Nervous	Nervous	Nervous	Nervous	Nervous	Nervous	Nervous
Feces										
Swimming	Slow	Slow	*	*	Slow	Slow	Slow	Slow	Slow	*
Secretions	Mucosity	Mucosity	Mucosity	Mucosity	Mucosity	Mucosity	Mucosity	Mucosity	Mucosity	Mucosity

\* No signs were shown

**Cuadro 6**

CARACTERIZACIÓN DE SIGNOS Y LESIONES DE PECES DE ORNATO *Carassius auratus* INOCULADOS CON 103 ufc/ml  
 CARACTERIZACIÓN DIAGNÓSTICA

CHARACTERIZATION OF SIGNS AND LESIONS IN *Carassius auratus* FISH INOCULATED WITH 103 cfu/ml

<i>Characteristic</i>	<i>Fish 1</i>	<i>Fish 2</i>	<i>Fish 3</i>	<i>Fish 4</i>	<i>Fish 5</i>	<i>Fish 6</i>	<i>Fish 7</i>	<i>Fish 8</i>	<i>Fish 9</i>	<i>Fish 10</i>
Color	*	*	*	*	*	Dark	Dark	Opaque	Opaque	Dark
Skin	*	*	*	*	*	Mycosis	Mycosis	*	Mycosis	Mycosis
Scales	*	Desquamation	Desquamation	Desquamation	*	*	Desquamation	*	*	Desquamation
Fins and tail	Eroded	Mycosis	Mycosis	*	Retracted	Eroded	Mycosis	*	*	*
Mouth	*	*	Gasping abnormal	*	Gasping abnormal	*	Gasping abnormal	Gasping abnormal	Gasping abnormal	Gasping abnormal
Branchia	Hemorrhage	*	Breathing abnormal	*	Breathing abnormal	*	Breathing abnormal	Breathing abnormal	Breathing abnormal	Breathing abnormal
Eyes	Exophthalmus	*	Exophthalmus	*	*	*	*	*	*	*
Body	Abdomen swollen	Hemorrhage	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen	Abdomen swollen
Appetite	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia
Behavior	Nervous	Nervous	Nervous	Nervous	Nervous	Nervous	Nervous	Nervous	Nervous	Nervous
Feces										
Swimming	Erratic	*	*	*	*	Erratic	Erratic	Erratic	Erratic	Erratic
Secretions	*	*	*	*	*	Mucosity	*	Mucosity	*	Mucosity

\* No signs were shown

From the second phase, it can be inferred that this infection is not water-borne and requires the presence of a living host to develop.

The pathogenic capacity of the *Vibrio fluvialis* bacterium in *Carassius auratus* was proven, and the bacterium's aggressiveness was confirmed from its LD<sub>50</sub>, which was 50,000 CFU/ml.

Given the behavior of this bacterium in fish farms with unhealthy management and production conditions, it must be considered as a secondary pathogen in *Carassius auratus*.

## Referencias

1. Mc Graw B H. Furunculosis of fish U.S. Fish and Wildlife. Service Special Reports Fish 1952; 84.
2. Waluga D, Enzootion of focal colliacquative necrosis in *Abramis brama* (L.). Acta Hydrobiol 1962; 4: 29-38
3. Ross A J, Rucker R R, Ewing W H. Description of a bacterium associated with redmouth diseases of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Can J Microbiol 1966;12: 763-770.
4. Cisar J O, Fryer J R. An epizootic of vibriosis in *Chinook salmon*. Bull Wild Dis Assoc 1969; 5:73-76.
5. Kimura T. Studies on a bacterial diseases occurred in "Sukuramarasu" (*Oncorhynchus masou*) and pink salmon (*O. gorbuscha*) rearing for maturity. Scientific Reports of Hokkaido. Salmo Hatchery 1970;24: 9-10.
6. Pacha R E, Ordal E J. Myxobacterial diseases of Salmonids. In Snieszko, S.F., A symposium on diseases of fishes and shell-fishes. Am Fish Soci. Special Publication 1970; 5: 243-257.
7. Kimura T, Kitao T. On the etiologial agent of "bacterial tuberculosis" of seriola. Fish Pathol 1971; 6: 8-14.
8. Wakabayashi H, Egusa S. Characteristics of *Pseudomonas* sp. From a epizootic of pound cultured eels (*Anguilla japonica*). Bull Japanese Soc Sci Fish 1972; 38: 577-587.
9. Meyer F P, Bullock G L. *Edwardsiella tarda*, a new pathogen of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Appl Microbiol 1973; 25 : 155-156.
10. Mc Carthy D M. Fish Furunculosis caused by *Aeromonas salmonicida* var. *Achromogenes*. J Wild Dis 1975;11: 489-493.
11. De Figuereido J, Labarta J U. Virulence of different isolated of *Aeromonas hydrophila* in channel catfish. Aquaculture 1968; 11:349-354.
12. Hawke J P, Mc Whorter A C, Stergerwalt A G, Brenner G. *Edwardsiella ictaluri* sp. Nov, the causative agent of enteric septicemia of catfish. Int J Syst Bacteriol 1981; 31 (4): 396-400.
13. Love M T, Teebeken-Fisher D, Hose E J, Farmer J J, Hickman III FW, Fanning G R. *Vibrio damsela*, a marine bacterium, causes skin ulcers on the damselfish *Chrimis punctipinnis*. Sci 1981; 214: 1139-1140.

daño agudo en la vejiga natatoria, en las branquias y en el corazón; esto último obliga a los peces a subir a la superficie a captar burbujas de aire desarrollando un esfuerzo considerable para respirar. Otros rasgos clínicos incluyeron presencia de moco en forma de largos filamentos en la zona anal, ello manifiesta enteritis; la presencia de secreción excesiva de moco sobre el cuerpo activa mecanismos de defensa de primera línea contra la infección. Se considera que el cuadro clínico corresponde a septicemia hemorrágica por la hemorragia generalizada a todos los órganos internos, además de la presencia de petequias y forúnculos sobre el cuerpo y de los hilos de sangre en las aletas de los peces.

De acuerdo con los resultados obtenidos para otros cuadros clínicos por Hjelthnes y Roberts,<sup>34</sup> *V. fluvialis* puede ser considerado como patógeno muy agresivo, la patología mostrada por los peces puede asociarse a una respuesta arquetípica de la respuesta septicémica hemorrágica. El cuadro clínico puede ser asociado a dermionecrosis focal ulcerativa. Las lesiones son características de cuadros agudos de vibriosis y furunculosis.

La DL<sub>50</sub> obtenida fue equivalente a 50 000 ufc/mL (10<sup>4.5</sup> ufc/mL), que en comparación con la dosis experimental obtenida por otros autores,<sup>19,20,35</sup> al obtener experimentalmente la DL<sub>50</sub> de otras bacterias como *Aeromonas hydrophila* (10<sup>6</sup> ufc/mL), ubica a *V. fluvialis* como patógeno muy agresivo, dado que la virulencia de una bacteria guarda relación inversa a la cantidad de ufc/mL del inóculo.

De los resultados de la segunda fase se deduce que *V. fluvialis* es un patógeno que requiere de un hospedero vivo y que no puede ser transmitido vía el agua de los estanques; es decir, su trasmisión se realiza por contacto directo.

En conclusión, el comportamiento de *V. fluvialis* debe considerarse patógeno secundario de peces de ornato *Carassius auratus*, por lo que sus condiciones sanitarias de manejo deben mantenerse en estricta vigilancia, a riesgo de presentarse epizootia debido a su presencia en este tipo de granjas piscícolas.

14. Ranson D P, Lannan, C V, Rohovec L V, Fyer J L. Comparison histopathology and caused by *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii* in three species of Salmon. J Fish Dis 1984; 7: 107-115.
15. Egidius E, Wiik R, Andersen K, Hoff K A, Hjeltnes B. *Vibrio salmonicida* sp. nov., a new fish pathogen. Int J Syst Bacteriol 1986; 36: 518-520.
16. Lee J V, Shread P, Furniss A L, Bryant T N. Taxonomy and description of *Vibrio fluvialis* sp. Nov. (Synonym. Group F Vibrios Ef6). J Appl Bacteriol 1981; 50: 73-94.
17. Negrete R P, Romero J J. Estudio cualitativo de las condiciones sanitarias de producción y manejo de granjas acuícolas en los estados de México y Morelos. Revs Hidrobiol 1998; 8(1): 43-53.
18. Furst R. Microbiología. Frosbisher and Fuerst-14th. Bogota Colombia Ed Interamericana 1981.