Krieg, N.R. and J.G. Holt; 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins. Baltimore London.

Post, G. 1983. Textbook of Fish Health. TFH Publications, Inc. Ltd. p. 29.

Quadri, S.M.H.; L.P. Gordon; R.D. Wende and R.P. Williams. 1976. Journal of Clinical Microbiology 3:102-104.

Reichenbach-Klinke, H.H. 1982. Enfermedades de los peces. Ed. Acribia. Zaragoza, España.

Snieszko, S.F. 1973. Recent advances in scientic knowledge and developments pertaining to diseases of fishes. Adv. Vet. Sci. Comp. Med. 17:291-314.

Snieszko, S.F. 1981. Bacterial Gill Disease of freshwater fishes. U.S. Fish and Wildlife Service. United States Department of the Interior. Wash. D. C.

Snieszko, S.F. and J.L. Bullock 1968. Diseases of Freswater Fishes caused by Bacteria of the Genera **Aeromonas, Pseudomonas** and **Vibrio**. United States Department of the Interior. Wash. D. C.

Snieszko, S.F. and J.L. Bullock 1976. Columnaris Disease of Fishes. Fish Disease Leaflet 45. United States Department of the Interior. Wash. D. C.

Zarzuelo, E.P. 1981. Principales enfermedades infecciosas de los peces. Ed. Aedos. Barcelona, España.

C A P I T U L O 11

DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO

En las enfermedades bacterianas de los peces generalmente están involucrados microorganismos Gram negativos. Diversos autores han diseñado esquemas que permiten obtener un diagnóstico de la enfermedad y la identificación del agente etiológico.

Para el diagnóstico de las enfermedades bacterianas nunca deberá utilizarse peces muertos ya que al momento de morir estos, la proliferación de bacterias endógenas en sus tejidos es inmediata y nos llevará a obtener un diagnóstico equivocado. Por lo tanto, siempre deberán utilizarse peces sanos o moribundos.

Aunque el primer paso en el examen diagnóstico es investigar el tipo de bacterias presentes en los tejidos u órganos afectados, no hay que olvidar la posibilidad de que se detecten especies bacterianas agregadas a las que se sospecha como patógenas.

Para la colecta de las muestras, primeramente se coloca al pez en una charola previamente desinfectada con etanol al 70%, se observan los síntomas externos del pez y se procede a tomar el peso y medidas del mismo. Posteriormente se debe proceder a limpiar la superficie corporal utilizando un algodón impregnado con etanol al 70%. Para tomar muestras de la superficie externa del pez se deberá utilizar un hisopo o asa bacteriológica con la que se raspa desde la cabeza hasta la cola, posteriormente se deben realizar frotis directos que se fijan por calor y se tiñen por la técnica de Gram.

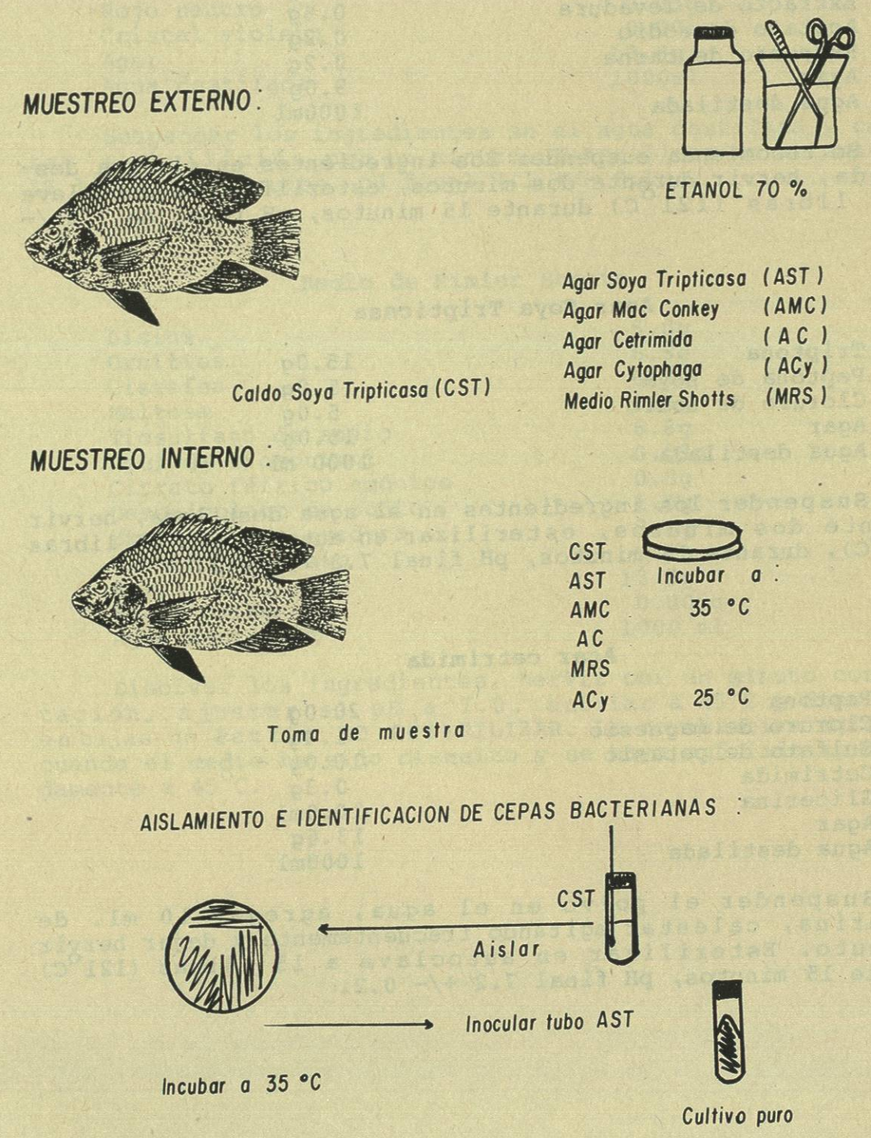
Con un bisturi flameado se secciona a lo largo de la superficie ventral para dejar expuestas las vísceras y organos como intestino, bazo, hígado, vejiga natatoria, vesícula biliar y branquias. Los órganos se colocan en cajas de Petri estériles que contienen solución salina para evitar el resecamiento, se toma el órgano y se realiza una incisión a través de la cual se introduce el hisopo o asa bacteriológica para retirar una muestra, la cual se deberá sembrar por duplicado por estría cruzada en tres campos en: agar soya tripticasa, agar Mac Conkey, agar cetrimida, Agar Rimler Shotts, agar Cytophaga y caldo soya tripticasa y se hacen frotis en la misma forma que cuando se muestreó externamente.

Las placas y tubos inoculados se deberán mantener a temperatura ambiente mientras se trasladan al laboratorio y una vez ahí, una serie de tubos se debe continuar incubando a temperatura ambiente y la otra a 35°C hasta que aparezca el crecimiento bacteriano.

Posteriormente, concluido el tiempo de incubación se procede a un examen macroscópico de las colonias a las cuales se les hace un frotis para conocer su morfología y su tinción al Gram; luego con el asa bacteriológica a partir de cada colonia diferente se toma un poco de ella y se resiembra en tubos conteniendo agar soya tripticasa (AST), los cuales se incuban a 35°C durante 24 horas y a partir de éstos se realizan las pruebas bioquímicas correspondientes para su identificación. Para lograr esto último, se debe sembrar en diferentes medios de cultivo, dependiendo de su tinción al Gram y de la respuesta a la prueba de oxidasa.

Una vez concluido el trabajo de laboratorio es necesario que tanto los peces examinados como el agua que sirvió para el transporte, así como el equipo y material de disección contaminado, sean esterilizados en autoclave o incinerados antes de ser desechados.

ANALISIS BACTERIOLOGICO DE PECES



COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS EN EL DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO

Agar Cytophaga (Anacker y Ordal)

Triptona	0.5g
Extracto de levadura	0.5g
Acetato de sodio	0.2g
Extracto de carne	0.2g
Agar	9.0g
Agua destilada	1000ml

Se recomienda suspender los ingredientes en el agua destilada, hervir durante dos minutos, esterilizar en autoclave a 15 libras (121°C) durante 15 minutos, pH final de 7.2+/- 0.2.

Agar Soya Tripticasa

Triptona	15.0g
Peptona de soya	5.0g
Cloruro de sodio	5.0g
Agar	15.0g
Agua destilada	1000 ml

Suspender los ingredientes en el agua destilada, hervir durante dos minutos, esterilizar en autoclave a 15 libras (121°C), durante 15 minutos, pH final 7.3 +/- 0.2.

Agar cetrimida

Peptona	20.0g
Cloruro de magnesio	1.4g
Sulfato de potasio	10.0g
Cetrimida	0.3g
Glicerina	10.0ml
Agar	13.6g
Agua destilada	1000ml

Suspender el polvo en el agua, agregar 10 ml. de glicerina, calentar agitando frecuentemente y dejar hervir 1 minuto. Esterilizar en autoclave a 15 libras (121°C) durante 15 minutos, pH final 7.2 +/- 0.2.

Agar Mac Conkey

Peptona	17.0g
Lactosa	10.0g
Proteasa-Peptona	3.0g
Sales biliares	1.5g
Cloruro de sodio	5.0g
Rojo neutro	0.03g
Cristal violeta	0.001g
Agar	13.5g
Agua destilada	1000ml

Suspender los ingredientes en el agua destilada y calentar a ebullición por un minuto. Esterilizar en autoclave a 15 libras/15 minutos. pH final 7.1 +/- 0.1.

Medio de Rimler Shotts

Lisina	5.0g
Ornitina	6.5g
Cisteína	0.3g
Maltosa	3.5g
Tiosulfato de sodio	6.8g
Azul de bromotimol	0.03g
Citrato férrico amónico	0.8g
Desoxicolato de sodio	1.0g
Extracto de levadura	3.0g
Cloruro de sodio	5.0g
Agar	13.5g
Novobiocina	0.005g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los ingredientes, hervir por un minuto con agitación, ajustar el pH a 7.0, enfriar a 45°C y distribuir en cajas de Petri. NO ESTERILIZAR. La novobiocina agregarla cuando el medio ha sido disuelto y se haya enfriado aproximadamente a 45°C.

DIFERENCIACION BIOQUIMICA

DETERMINACION	MEDIOS DE CULTIVO Y/O REACTIVOS	TEMPERATURA Y TIEMPO DE INCUBACION (°C/h)	OBSERVACIONES
Oxidasa	Clorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina		(+) Púrpura-negro
Motilidad	MIO	35 / 24	Crecimiento difuso en el medio
Indol	1) MIO 2) Caldo triptona 3) SIM / Kovac's	35 / 24	(+) Anillo púrpura en la superficie del medio.
Descarboxilación de la ornitina.	MIO	35 / 24	(+) Púrpura (−) Amarillo
Producción de acetil-metil-carbinol (acetoína)	MR-VP / KOH + naftol	35 / 48	(+) Rojo brillante en la superficie del tubo.
Rojo de metilo	MR-VP / Rojo de metilo (ac)	35 / 48	(+) Rojo (−) Amarillo
Reducción de nitratos	Caldo nitrato / ∝ naftilamina ac. sulfanílico	35 / 48	(+) Rojo (−) Amarillo
Oxidación-Fermentación	Medio base OF Hugh Leifson/con y sin aceite mineral + Carbohidrato.	35 / 48	(amarillo+/amarillo+) Fermentativo (amarillo+/azul−) Oxidativo (azul−/azul−) No reacción
Utilización de citratos como unica fuente de carbono.	Agar citrato de Símmons	35 / 48	(+) Azul (−) Verde
Hidrólisis del almidón	Agar almidón	35/ 48	(+) Zona clara alrededor de la estría
Hidrólisis de la gelatina	Gelatina nutritiva	35/ 48	(+) Medio líquido (−) Medio solido
Acción sobre los carbohidratos.	1) TSI	35/ 48	1) K/A alcalino/ácido K/N alcalino/neutro A/A ácido/ácido
	2) Caldo púrpura de bromocresol + 1% del carbohidrato.	35/ 48	2) (+ácido) − amarillo (+gas) − burbuja
Descarboxilación de la lisina.	LIA	35/ 24	K/A alcalino/ácido K/N alcalino/neutro A/A ácido/ácido
Utilización del malonato	Caldo malonato	35/ 24-48	(+) Azul (−) Verde
Desaminación de la fenil-alanina.	Caldo malonato / HCl 0.1 N / $FeCl_3$ 10 %	35/ 24-48	(+) Verde (−) Amarillo
Hidrolisis de la urea	Agar urea	35/ 48	(+) Rosa (−) Amarillo
Producción de H_2S	1) TSI 2) SIM	35/ 24	(+) Negro (−) Rojo o amarillo
Crecimiento a 37 y 42 °C	Caldo soya tripticasa	37/ 24 42/ 24	(+) Turbidez en el medio (−) Transparencia en el medio
Tolerancia al cloruro de sodio.	Caldo soya tripticasa + 3 y 6 % de cloruro de sodio.	35/ 24	(+) Turbidez en el medio (−) Transparencia en el medio

CARACTERISTICAS DE ALGUNAS ESPECIES DEL GENERO Aeromonas.

CARACTERISTICAS	A. hydrophila	A. caviae	A. sobria	A. salmonicida	A. achromogenes	A. masoucida
MOTILIDAD	+	+	+	+	+	+
COCOBACILOS EN PARES	−	−	−	+	+	+
CADENAS O MASAS	+	+	+	−	−	−
BACILOS SIMPLES Y EN PARES	−	−	−	+	+	+
PIGMENTO CAFE SOLUBLE EN AGUA	+	+	+	−	−	−
CRECIMIENTO EN CALDO NUTRITIVO A 37 °C	+	+	+	+	+	+
FERMENTACION DE SACAROSA (A)	+	+	+	+	+	+
FERMENTACION DEL MANITOL (A)	+	+	+	+	+	+
FERMENTACION DE LA GLUCOSA (G)	+	+	+	+	+	+
INDOL	+	+	+	−	+	+
ACETOINA	+	+	d	−	−	−
H_2S (CISTEINA)	+	+	+	−	−	−

SIMBOLOGIA : + = POSITIVO 90-100 %
− = POSITIVO 0-10 %
d = POSITIVO 26-75 %
A = ACIDO
G = GAS