

**EFFECTO DE DIETAS CON MEZCLAS DE LPS, β -GLUCANOS Y
Lactobacillus casei SOBRE EL SISTEMA INMUNE, EL ESTADO DE
SALUD Y LA RESISTENCIA A *Aeromonas hydrophila* EN TILAPIA ROJA
(*Oreochromis spp*)**



MÓNICA ANDREA VÁSQUEZ PIÑEROS

Bióloga Marina cMSc

**UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS
INSTITUTO DE ACUICULTURA DE LOS LLANOS – IALL
VILLAVICENCIO - META**

2011

**EFFECTO DE DIETAS CON MEZCLAS DE LPS, β -GLUCANOS Y
Lactobacillus casei SOBRE EL SISTEMA INMUNE, EL ESTADO DE
SALUD Y LA RESISTENCIA A *Aeromonas hydrophila* EN TILAPIA ROJA
(*Oreochromis spp*)**

MÓNICA ANDREA VÁSQUEZ PIÑEROS

Bióloga Marina cMSc.

Director:

PEDRO RENÉ ESLAVA MOCHA

MV. M.Sc

Codirectora:

Judith Figueroa Ramírez

Microbiol. MSc

**Trabajo presentado para optar al título de Magister en Acuicultura –
Aguas Continentales**

**UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS
INSTITUTO DE ACUICULTURA DE LOS LLANOS – IALL
VILLAVICENCIO - META**

2011

EFFECTO DE DIETAS CON MEZCLAS DE LPS, β -GLUCANOS Y
Lactobacillus casei SOBRE EL SISTEMA INMUNE, EL ESTADO DE
SALUD Y LA RESISTENCIA A *Aeromonas hydrophila* EN TILAPIA ROJA
(*Oreochromis spp*)



MÓNICA ANDREA VÁSQUEZ PIÑEROS

APROBADO

JURADO 1

JURADO 2

DIRECTOR

CODIRECTORA

DEDICATORIA

A Dios por iluminar siempre mi camino

A Jorge y Edilma, mis padres y pilares de mi vida

A Lida, Luz, Mateo, Juan Pablo y Jeronimo por ser fuente de alegría y cariño



AGRADECIMIENTOS

Especialmente a mis orientadores el profesor Pedro René Eslava Mocha por su gran apoyo, orientación y enseñanzas y a la profesora Judtih Figueroa por sus enseñanzas, confianza y total disposición de Laboratorio de Microbiología en la Universidad Nacional.

A David Gómez por su invaluable colaboración durante la fase experimental y manejo de peces.

A lang Rondón por su gran apoyo y valiosas enseñanzas.

A la profesora Luz Adíela Gómez y Alejandra Carrión por su colaboración y apoyo con las instalaciones del laboratorio de Microbiología de la Universidad de los Llanos.

Al Instituto de Investigaciones de la Orinoquia IIOC por el apoyo financiero para la realización del presente trabajo.

MAET
00004
Ej 1

TABLA DE CONTENIDO



INTRODUCCION	14
RESUMEN	16
CAPÍTULO I: ARTICULO DE REVISIÓN. Probióticos e inmunoestimulantes en peces: β -glucanos, LPS y <i>Lactobacillus sp.</i>	
RESUMEN	18
ABSTRACT	19
INTRODUCCION	20
INMUNOESTIMULANTES: DEFINICIÓN Y USOS	20
β -GLUCANOS	23
LIPOPOLISACÁRIDOS (LPS)	25
BACTERIAS PROBIÓTICAS: <i>Lactobacillus sp.</i>	29
PERSPECTIVAS Y CONCLUSIONES	37
BIBLIOGRAFÍA	
CAPITULO II: Efecto de mezclas experimentales de <i>Lactobacillus sp.</i> , LPS y β -glucanos, sobre parámetros hematológicos, anatomopatológicos y de explosión respiratoria en tilapia híbrida (<i>Oreochromis spp.</i>).	
RESUMEN	46
ABSTRACT	47
INTRODUCCIÓN	49
OBJETIVO GENERAL	51
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
METODOLOGÍA	52
RESULTADOS	62
DISCUSIÓN	76
CONCLUSIONES	82
BIBLIOGRAFÍA	

CAPITULO III: Efecto protector de dietas inmunoestimulantes con β -glucanos y *Lactobacillus casei* ante la infección experimental con

Aeromonas hydrophila

RESUMEN	88
ABSTRACT	89
INTRODUCCION	91
OBJETIVOS GENERAL	93
OBJETIVO ESPECIFICO	93
MATERIALES Y METODOS	94
RESULTADOS	99
DISCUSIÓN	107
CONCLUSIONES	114
BIBLIOGRAFIA	
CONCLUSIONES GENERALES	122

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I: ARTICULO DE REVISIÓN. Probióticos e inmunoestimulantes en peces: beta-glucanos, LPS y *Lactobacillus sp*

Figura 1. Estructura de β -glucanos de la pared celular de una levadura. 24

Figura 2. Unidad típica de polisacárido mostrando las diferentes regiones 26

Figura 3. Esquema de las diferencias entre peces y mamíferos a la respuesta por LPS 28

CAPITULO II: Preparación, suministro y selección de mezclas inmunoestimulantes y su efecto sobre parámetros fagocíticos, hematológicos y anatomopatológicos en tilapia híbrida

Figura 1. Fase acuosa donde se encuentra el LPS crudo, obtenido mediante el método butanol-agua 63

Figura 2. Precipitado en donde se encuentra el β -glucano, la fase acuosa corresponde al componente manosa de la pared de *S. cerevisiae*. 63

Figura 3. Halo de inhibición mostrado por tres cepas de bacterias ácido lácticas evaluadas 64

Figura 4. Estomago. Apariencia normal dieta LPS con β -glucanos, durante la primera semana 400x. 73

Figura 5. Estomago. Apariencia normal. Dieta control segunda semana 400x.	73
Figura 6. Estomago. Apariencia normal, segunda semana <i>L. casei</i> con β -glucanos. 400x	73
Figura 7. Intestino. Apariencia normal. Dieta β -glucanos con <i>L. casei</i> tercera semana 400x.	74
Figura 8. Intestino. Dieta LPS con <i>L. casei</i> cuarta semana 400x.	74
Figura 9. Bazo dieta control, durante la primera semana de alimentación. 100x.	74
Figura 10. Bazo dieta con <i>L. casei</i> y β -glucanos, durante la segunda semana de alimentación. Nótese mayor abundancia de CMM 100x.	75
Figura 11. Bazo dieta con <i>L. casei</i> y β -glucanos, durante la segunda semana de alimentación. Aumento de CMM 4000x.	75
Figura 12. Hígado dieta LPS con β -glucanos durante la primera semana de alimentación 400x. Se observan cambios degenerativos leves de tipo hidrópico principalmente en algunos hepatocitos	75
Figura 13. Hígado dieta control durante la tercera semana de alimentación 400x	76
Figura 14. Hígado dieta control durante la cuarta semana de alimentación 100x	76
CAPITULO III: Desafío por inmersión, dosis letal 50 y efecto protector de dietas inmunoestimulantes con β - glucanos y <i>Lactobacillus casei</i> ante la infección con <i>Aeromonas hydrophila</i>	

Figura 1. Intestino de animales control, posterior al baño. 100x	100
Figura2. Estómago control post-baño 8 horas <i>A. hydrophila</i> 400x	100
Figura 3. Submucosa estómago pos-baño hora 0. <i>A. hydrophila</i> 400x.	100
Figura 4. Intestino peces 6 horas post-baño con <i>A. hydrophila</i> .	101
Figura 5. Lámina propia de la mucosa estómago horas posterior al baño con <i>Aeromonas hydrophila</i> , se observa leve congestión y presencia de CGE. 1000x	101
Figura 6. Intestino peces 6 horas post-baño con <i>A. hydrophila</i> 400x.	101
Figura 7. Intestino peces 8 horas post-baño con <i>A. hydrophila</i> 400x	102
Figura 8. Estomago con leve infiltrado en lámina propia post-baño <i>A. hydrophila</i> hora 8.	102

LISTA DE GRAFICAS

CAPITULO II: Preparación, suministro y selección de mezclas inmunoestimulantes y su efecto sobre parámetros fagocíticos, hematológicos y anatomopatológicos en tilapia híbrida.

- Gráfica 1. . Valores de explosión respiratoria (Densidad óptica DO), en peces alimentados con diferentes inmunoestimulantes. 68
- Gráfica 2. Valores de hematocrito en peces alimentados con diferentes inmunoestimulantes. 69
- Gráfica 3. Valores de Linfocitos en peces alimentados con diferentes inmunoestimulantes. 69
- Gráfica 4. Valores de monocitos en peces alimentados con diferentes inmunoestimulantes. 70
- Gráfica 5. Valores de neutrófilos en peces alimentados con diferentes inmunoestimulantes. 71



LISTA DE TABLAS

CAPÍTULO I: ARTICULO DE REVISIÓN. Probióticos e inmunoestimulantes en peces: beta-glucanos, LPS y *Lactobacillus sp.*

Tabla 1. Estudios de β -glucanos como inmunoestimulantes en peces	31
Tabla 2. Estudios de efectos <i>in vivo</i> de LPS en peces	33
Tabla 3. Estudios de <i>Lactobacillus</i> como probióticos en peces	34
Tabla 4. Estudio <i>in vivo</i> del efecto de mezclas de componentes microbianos, administrados por diferentes vías	36

CAPITULO II: Preparación, suministro y selección de mezclas inmunoestimulantes y su efecto sobre parámetros fagocíticos, hematológicos y anatomopatológicos en tilapia híbrida

Tabla 1. Cantidad de los inmunoestimulantes, probióticos y SSF adicionada al concentrado para la realización del pellet control y experimental	58
Tabla 2. Características de tinción, crecimiento, catalasa y halo de inhibición de cepas ácido lácticas con potencial uso probiótico	64
Tabla 3. Porcentaje promedio de sobrevivencia a pH 4 y pH 7,5 después de tres horas de incubación, de cepas ácido lácticas antagónicas de <i>Aeromonas hydrophila</i> .	65
Tabla 4. Porcentaje promedio de sobrevivencia a 37°C y 45°C, después de tres horas de incubación, de cepas ácido lácticas antagónicas de <i>Aeromonas hydrophila</i> y tolerantes a pH 4 y 7,5.	65

Tabla 5. Viabilidad de la bacteria posterior a la adición del concentrado mantenido a 4°C 66

Tabla 6. Valores de NBT, porcentaje del hematocrito (%HTO), linfocitos (%LINF), monocitos (%MON), neutrófilos (%NEUTRO), eosinófilos (%EOSINO) y basófilos (%BASOF), obtenidos durante el suministro de las dietas inmunoestimulantes durante las cuatro semanas experimentales 67

CAPITULO III: Desafío por inmersión, dosis letal₅₀ y efecto protector de dietas inmunoestimulantes con β - glucanos *Lactobacillus casei* ante la infección con *Aeromonas hydrophila*

Tabla 1. Resumen de los hallazgos microscópicos encontrados en intestino y estómago de animales expuestos, según su aparición por horas después del baño con *A. hydrophila* y baño control 99

Tabla 2. Valores de UFC/placa de los recuentos de viables realizados en las diferentes diluciones de la solución madre 103

Tabla 3. Valores del promedio de número de peces muertos, vivos, porcentajes y valores acumulados de peces inyectados con diferentes concentraciones de *A. hydrophila*. 104

Tabla 4. Promedio del porcentaje de mortalidad de los grupos control y tratamiento de dietas control y dieta inmunoestimulante después del reto intraperitoneal con *A. hydrophila* inyección con SSFE como control 106

INTRODUCCION

La acuicultura ha tenido el más rápido crecimiento en el sector de producción de alimentos de origen animal, participando de manera importante dentro de la seguridad alimentaria. Para poder mantener este patrón de crecimiento con sostenibilidad, es necesario el desarrollo de herramientas sanitarias más allá del uso de antibióticos y quimioterapias que pueden ser contraproducentes a largo plazo, ya que inducen resistencia bacteriana e inmunosupresión en el hospedero, aunado a los problemas de tipo ambiental. Desde hace varias décadas los inmunoestimulantes han despertado gran interés, ya que basan su principio en la estimulación del sistema inmune innato, mostrando mejoramiento del estado sanitario de los animales por el incremento de la resistencia frente a patógenos. Dentro de los inmunoestimulantes más utilizados en peces se encuentran los β -glucanos, los lipopolisacáridos y se incluyen las bacterias benéficas, denominadas probióticos. Los estudios realizados en peces se han enfocado en evaluaciones *in vitro* e *in vivo* de las respuestas celulares y humorales, acerca de la modulación de transcripción génica y los efectos de resistencia frente a patógenos de interés; mostrando de manera general efectos positivos sobre el estado inmunológico de los peces y resistencia a enfermedades.

Sin embargo, es importante tener en cuenta, que para acercarse al entendimiento y futuro establecimiento de prácticas alternativas de manejo sanitario donde se incluya el suministro de inmunoestimulantes y probióticos, se hace necesario el planteamiento de trabajos dentro de un contexto local, que apunten a la rigurosa evaluación de cada uno de los componentes potenciales inmunoestimulantes de interés, aplicados a especies de importancia comercial de la región, que se estén viendo afectadas por el crecimiento e intensificación de los sistemas; trabajos que permitan el establecimiento a futuro, de herramientas tecnológicamente viables y que satisfagan las necesidades sanitarias regionales más apremiantes.

El siguiente documento recoge el trabajo de investigación que se presenta dividido en tres capítulos de la siguiente manera: Capítulo I, aborda la revisión de literatura de los trabajos realizados con inmunoestimulantes, principalmente de LPS (Lipopolisacáridos), β -glucanos y bacterias probióticas en peces, presentando las definiciones, de inmunoestimulantes, diversidad, mecanismos de acción, usos en acuicultura y se discuten las perspectivas de los trabajos en el área. En el segundo capítulo se describe, como se lleva a cabo la consecución de los inmunoestimulantes y probióticos, a través de la extracción de LPS, β -glucanos y la selección de cepas microbianas con potencial probiótico, y posteriormente evaluando su inclusión en el alimento para dar paso a las evaluaciones *in vivo* a través del monitoreo de algunos parámetros del sistema inmune innato en peces. El tercer capítulo, describe la evaluación que pone a prueba la capacidad de los inmunoestimulantes para generar mayor resistencia frente a un patógeno de importancia regional, realizando previamente la estandarización de técnicas apropiadas para la infección experimental.

Este trabajo constituye un paso preliminar para la experimentación de herramientas alternativas para el control y prevención de enfermedades en el área acuícola del país.



RESUMEN

La presente investigación muestra el trabajo recolectado de diferentes experimentos llevados a cabo con el fin de establecer una dieta con mezclas inmunoestimulantes que confirieran un mejor estado de salud y una mejor resistencia a enfermedades en alevinos de tilapia híbrida. Para tal fin se establecieron dos fases experimentales, descritas en los dos últimos capítulos. El segundo capítulo, describe la primera fase experiemental, en donde se extrajeron LPS de cepas de *Escherichia coli*, y β -glucanos provenientes de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* mediante dos técnicas que permitieran el mejor rendimiento; adicionalmente se evaluaron de manera *in vitro* diferentes cepas ácido lácticas, en donde la cepa *Lactobacillus casei* mostró las mejores características probióticas, por lo que se seleccionó para incluirlas dentro de las mezclas experimentales, así mismo esta bacteria demostró una óptima viabilidad durante los procesos de inclusión en el pelet y mantenimiento durante la fase experimental. Posteriormente, se describen las pruebas *in vivo* en alevinos de tilapias híbridas alimentadas por cuatro semanas con diferentes dietas, que constaban de mezclas de LPS con β -glucanos, *Lactobacillus casei* con β -glucano y *Lactobacillus casei* con LPS, los resultados mostraron que luego de dos semanas con la dieta con *Lactobacillus casei* y β -glucanos, los peces mostraron los valores más altos de explosión respiratoria de leucocitos, incremento en el porcentaje de linfocitos y activación de centros melanomacrófagos (CMM), las otras dietas con inclusión de LPS con β -glucanos, *Lactobacillus casei* con β -glucanos y *Lactobacillus casei* con LPS, no mostraron diferencias significativas con respecto al control.

Debido a que esta mezcla de inmunoestimulantes fue la de mejor desempeño, se utilizó para la evaluación del efecto protector en peces al desafío contra *Aeromonas hydrophila* que se describe en el tercer capítulo. En este último capítulo se evalúan técnicas de infección experimental por inmersión con *Aeromonas hydrophila*, en donde se evidencian signos clínicos típicos y lesiones microscópicas leves en intestino y estómago, se determina la LD₅₀

para *A. hydrophila* en alevinos de tilapia híbrida, con un valor de $1,1 \times 10^{7,6}$ UFC por pez en ocho días. Para finalizar, la dieta seleccionada en la fase anterior, se suministró por dos semanas a alevinos de tilapia que posteriormente fueron desafiados intraperitonealmente con una LD_{50} de *Aeromonas hydrophila*, observando que la dieta otorgó un incremento de la resistencia ante este patógeno. En conclusión, la mezcla de *Lactobacillus casei* y β -glucanos suministrada en la dieta, es adecuada para su uso como una posible herramienta de prevención de enfermedad.

CAPITULO I

ARTICULO DE REVISIÓN

PROBIÓTICOS E INMUNOESTIMULANTES EN PECES: BETA-GLUCANOS, LPS y *Lactobacillus sp.*

Vásquez-Piñeros MA¹

¹Bióloga Marina, Esp. cMSc Grupo de Investigación en Sanidad de Organismos
Acuáticos, IALL.

Email: mandreavasquez@gmail.com

RESUMEN

Los inmunoestimulantes son principalmente, elementos estructurales de microorganismos, que basan su principio en la estimulación del sistema inmune innato, mostrando mejoramiento del estado sanitario de los animales e incremento de la resistencia frente a patógenos. Dentro de los inmunoestimulantes más utilizados en peces se encuentran los β -glucanos, los lipopolisacáridos y se incluyen las bacterias benéficas, denominadas probióticos. Los estudios realizados en peces se han enfocado en evaluaciones *in vitro* e *in vivo* de las respuestas celulares y humorales, acerca de la modulación de la transcripción génica y los efectos de resistencia frente a patógenos de interés; mostrando de manera general efectos positivos sobre el estado inmunológico de los peces y resistencia a enfermedades. El objetivo del presente capítulo es revisar algunos mecanismos de acción de los inmunoestimulantes, conceptualizar su uso en acuicultura, y discutir acerca de algunos trabajos actuales de investigación del tema, como base para el planteamiento de investigaciones pertinentes y factibles para abordar preliminarmente, algunas de las problemáticas actuales de la región en el área sanitaria piscícola.

Palabras clave: sistema inmune, enfermedad, peces, acuicultura, sanidad, control de enfermedades.

ABSTRACT

Immunostimulants are mainly structurally elements of micorganisms, it is principle it is based on immune innate system stimulation, showing a health status improvement of animlas and increased of disease resistance against pathogens. Among the immunostimilants more used in fish, are β -glucanas, lipopolysaccharide and it is included benefic bacteria, called probiotics. The studies made in fish, are being focused on testing *in vitro* and *in vivo* cellular and humoral responses, and about modulation of the transcriptional genes, and the resistance effect against pathogens of interest; showing, in general way, positive effects on the immunological status of fish and disease resistance. The aim of the present chapter is to review about some mechanism of actions of immunostimualnts, conceptualizing about its use in aquaculture, and discuss about some current research works about this topic, taking them as a base to setting fasibles research works to approach preliminarily, some of the current problems of the region in health fish area.

Key words: immune system, disease, fish, aquaculture, health ,disease control.



INTRODUCCION

Actualmente, la acuicultura incluyendo la piscicultura tiene un amplio crecimiento considerando las necesidades de seguridad alimentaria en diversos países y, dadas sus características de producción que incluyen mayor aprovechamiento del espacio comparada con otros sistemas de producción y un rápido ciclo de producción, constituye uno de los pilares de la economía pecuaria (Kapetsky y Nath, 1997; FAO, 2009; SOFIA, 2009), por lo cual se han diseñado alianzas estratégicas y redes internacionales que fortalezcan este sector, que estimulen los sistemas de producción y reduzcan el impacto ambiental (SOFIA, 2009; FAO, 2010). No obstante, el incremento en la presión de producción, con el fin de ser más competitivos frente a las exigencias de los mercados y la necesidad de elevar la eficiencia de la producción, propicia la aparición de enfermedades principalmente en sistemas intensivos, por lo que se opta por la terapéutica farmacológica como respuesta inmediata. No obstante, la demanda de productos orgánicos así como la evidencia de resistencia a antibióticos y antimicrobianos en peces requiere la búsqueda de alternativas preventivas que mitiguen la morbi-mortalidad en las producciones acuícolas. Aunque algunas sustancias inmunoestimulantes responden a esta necesidad, se requieren estudios rigurosos en diferentes especies de consumo que validen la efectividad del uso de estos productos de manera cotidiana en la disminución de la casuística patológica en los sistemas de producción.

INMUNOESTIMULANTES: DEFINICIÓN Y USOS

Los inmunoestimulantes se han definido como sustancias que potencian el sistema inmunitario y aumentan la resistencia frente a las enfermedades infecciosas (Rodríguez *et al.*, 2003). Raa (2000), los enmarca como compuestos químicos, los cuales existen como elementos estructurales principalmente de las bacterias, hongos miceliales y levaduras, que activan los leucocitos y por tanto confieren al animal mayor resistencia a las enfermedades causadas por virus, bacterias, hongos y parásitos. Por otro lado, Sahoo (2007),

los definió como compuestos químicos, (sintéticos o naturales), que actúan sobre los mecanismos de respuesta inmune del hospedero para el control de patógenos.

Los inmunoestimulantes se caracterizan por tener repeticiones de ciertas moléculas (tales como glucosa, ribosa, ácidos grasos, ciertas lipoproteínas, entre otras moléculas) que son estructuras abundantes y conservadas en comunidades microbianas de procariontes (Dalmo y Bøggwald, 2008), y están ausentes o difieren en estructura de las células eucariotas, tales estructuras son denominadas: Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs) (estructuras encontradas también en microorganismos potencialmente patógenos).

Los PAMPs son capaces de unirse a receptores de células centinelas, como macrófagos, células dendríticas, células mast (para el caso de mamíferos) o granuladas eosinofílicas para el caso de los peces. La unión de los PAMPs a los receptores, activa vías de señalización intracelular y causa que las células centinelas secreten moléculas que disparan la respuesta inmune (Tizard, 2009).

Dentro de los inmunoestimulantes se pueden encontrar: a) elementos estructurales de las bacterias (Lipopolisacáridos LPS, lipopéptidos, glicoproteínas capsulares y muramilpéptidos); b) productos de β -1,3/1,6 glucanos, provenientes de bacterias, hongos miceliales y levaduras; c) carbohidratos con estructuras complejas (glucanos) de varias fuentes biológicas incluyendo algas; péptidos presentes en extractos de ciertos animales o hechos por hidrólisis enzimática de proteínas de peces; nucleótidos y productos sintéticos; d) también se encuentran algunos alimentos poseedores de un efecto beneficioso sobre la salud (también conocidos como nutraceuticos) (Raa, 2000), vitaminas (C, E, A, D), carotenos, minerales (zinc, cobre, manganeso, cobalto, yodo, flúor, entre otros), que actúan principalmente como inmunomoduladores (Rondón, 2004); e) probióticos, definidos como microorganismos vivos que confieren un efecto fisiológico benéfico sobre el

hospedero (Fuller, 1989), estos incluyen bacterias del genero *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Vibrio*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus* y *Shewanella* y levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* entre otros (Verschuere, 2000).

A finales de la década de los ochenta comenzaron a emplearse inmunoestimulantes y probióticos en acuicultura, principalmente para aumentar la duración de la actividad de la respuesta inmunitaria inespecífica, que se caracteriza por tener un modo de acción generalizado (no actúan contra un microorganismo específico), por lo que tienen un uso profiláctico general. (Rodríguez *et al.*, 2003).

Los primeros estudios sobre inmunomodulación de teleósteos se realizaron *in vitro* y, posteriormente, *in vivo*. *In vivo* estas sustancias pueden administrarse por inyección (técnica costosa que implica manipulación de los peces), o bien disueltas en el agua, es decir, mediante baño de los animales (que también implica manipulación y con ello, estrés). El modo más reciente de aplicación de inmunoestimulantes es a través de la dieta, lo que ofrece muchas ventajas ya que resulta menos costoso y no implica manipulación de ejemplares (Rodríguez *et al.*, 2003).

En la actualidad, se estudia su uso combinado con vacunas y antibióticos, así como el efecto de mezclas de inmunoestimulantes, evaluados a través de diferentes mecanismos de defensa inespecíficos; sin embargo, muchas veces los resultados son difíciles de evaluar y no ha sido fácil identificar un biomarcador efectivo para la resistencia a enfermedades en peces. Aoshima *et al* (2005) (citado por Rodríguez, *et al.*, 2003), plantearon que un incremento en las respuestas de defensa no específicas *in vitro* no siempre reflejan el incremento de resistencia a la enfermedad, por tanto, las respuestas integradas adecuadas de varios mecanismos deben ser probadas con un desafío artificial estandarizado con un agente infeccioso. Así, la mayoría de reportes han descrito la resistencia a infecciones bacterianas principalmente en los desafíos de enfermedad (Nakagawa, 2007).

En Colombia, se han desarrollado pocos trabajos en el área. En 2004, se reportó por primera vez la utilización de microorganismos en la dieta de peces, en donde se evaluó el efecto de la inclusión de bacterias probióticas (*Lactobacillus acidophilus* y *Bacillus subtilis*) y prebióticos (pared de *Saccharomyces cerevisiae*) en la dieta para la alimentación de alevinos de cachama blanca (*Piaractus brachyomus*), como promotores del crecimiento (Pérez, 2004). Más recientemente, se reportó un mejoramiento de la tasa de conversión alimenticia, tasa de crecimiento específico e incremento diario de peso en tilapias nilóticas alimentadas con *Bacillus* y *Lactobacillus* (Martínez *et al.*, 2008a), adicionalmente los autores revelaron antagonismo *in vitro* de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* contra dos patógenos de peces *Streptococcus agalactiae* y *Aeromonas hydrophila*, paralelamente realizaron ensayos *in vivo*, donde se demostró mayor sobrevivencia de peces alimentados con *Bacillus sp.*, y *Lactobacillus casei* y desafiados a estos patógenos (Martínez *et al.*, 2008b). Sin embargo, a pesar de los resultados favorables, tanto en productividad como sobre el estado de salud de los peces, la investigación en esta área es aún muy incipiente en el país, limitando su uso y aplicación tecnológica que favorecería la productividad de los sistemas piscícolas en Colombia.

Dentro de los inmunoestimulantes más comúnmente utilizados en peces, se encuentran los β -glucanos (principalmente extraídos de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*), las bacterias ácido lácticas (género *Lactobacillus*) y LPS (lipopolisacáridos).

2.2 β -GLUCANOS

Estructura de β -glucanos

El nombre de los β -glucanos proviene del prefijo *Gluc*, que significa poliglucosa y *an*, que es sufijo para (homopolisacáridos). β (1,3)-D glucanos, es el término más común para los homopolisacáridos que tienen uniones β (1,3)-D en el

esqueleto, y también pueden poseer uniones β -D glucosídicas en posición 6 (Dalmo y Bøgwald, 2008) (Figura 1).

En la naturaleza, los β -glucanos se encuentran en plantas, algas, bacterias, hongos y levaduras (Selvaraj *et al.*, 2005a). Los β -glucanos de las levaduras son carbohidratos que consisten en glucosa y manosa como principales constituyentes de la membrana celular (Dalmo y Bøgwald, 2008; Mantovani *et al.*; 2008).

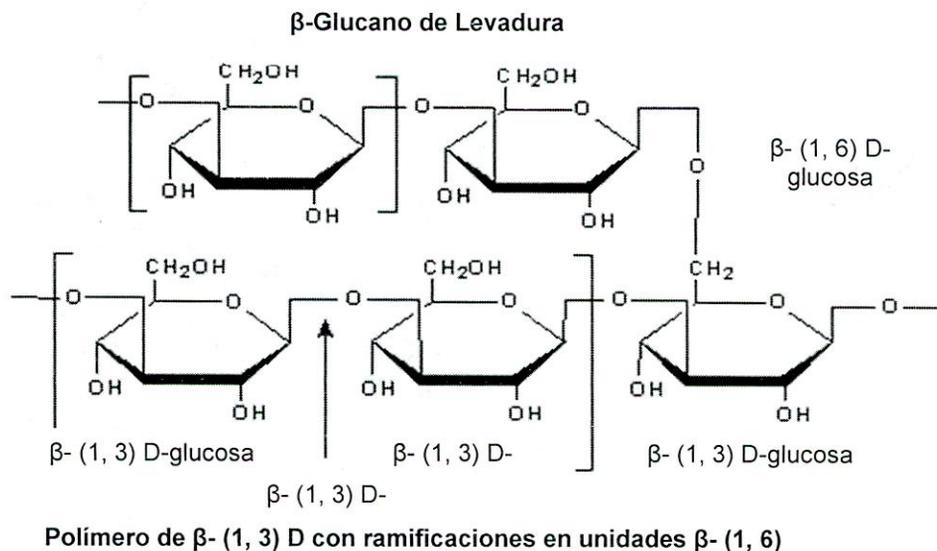


Figura 1. Estructura de β -glucanos de la pared celular de una levadura (Tomado de Volman *et al.*, 2008).

Reconocimiento de β -glucanos

Existe la colaboración de diferentes familias de receptores de membrana para el reconocimiento de los β -glucanos, las opsoninas no clásicas y el complemento mejoran la afinidad de unión y la especificidad. Dentro de los receptores que pueden reconocer estas estructuras están: receptores scavengers, dectina 1, receptores de complemento 3 (CD11/CD18) (CD moléculas de superficie marcadoras de diferenciación) y el complejo TLR 2/6 (por sus siglas en inglés, *toll like receptor*) (Dalmo y Bøgwald, 2008; Brown y Gordon, 2003).

Efecto de β -glucanos en peces

Se ha demostrado que el reconocimiento de β -glucanos activa directamente los leucocitos, estimula la fagocitosis, la actividad citotóxica y antimicrobiana, incluyendo la producción de especies reactivas intermediarias de nitrógeno y oxígeno; adicionalmente, estos carbohidratos estimulan la producción de mediadores proinflamatorios, citoquinas y quimioquinas, como IL-8 (Interleuquina), IL-1 β , IL-6 y TNF α (Factor de necrosis tumoral alfa), otorgando una mejor y más rápida capacidad de respuesta, que repercute en una mayor resistencia a patógenos (Palic *et al.*, 2005; Brown y Gordon, 2003; Rodríguez *et al.*, 2003; Misra *et al.*, 2006, Selvaraj *et al.*, 2006).

En peces, se ha demostrado que el efecto de los β -glucanos, depende de: la cantidad incorporada en la dieta, la duración en la alimentación, temperatura ambiental y la especie de estudio. Los β -glucanos solubles pueden ser absorbidos por el intestino y por tanto ser nutritivos. Se ha demostrado su efecto en: inmunoestimulación de peces sanos, inmunoestimulación en peces inmunocomprometidos, inmunoestimulación por inyección (así como su efecto adyuvante), estimulación de la inmunidad adaptativa y su efecto junto a vacunas (Selvaraj *et al.*, 2006; Palic *et al.*, 2006; Dalmo y Bøgwald, 2008). Algunos de los estudios de inmunoestimulación por β -glucanos en peces, se resumen en la tabla 1.

LIPOPOLISACÁRIDOS (LPS)

Estructura de los LPS

Los Lipopolisacáridos son componentes complejos de la membrana externa celular de bacterias Gram negativas, conocidos como endotoxinas. Generalmente son sustancias de gran peso molecular con una única estructura química, que consta de tres regiones: una región externa (conocida como antígeno O, componente lineal o ramificado de residuos de oligosacáridos), una región de polisacáridos del núcleo (que consiste en cadenas cortas de

azúcares), y una región interna rica en ácidos (*i.e.* lípido A con unidades de diglucosamina con ácidos grasos de cadena larga) (Swain *et al.*, 2008; Madigan *et al.*, 1995) (Figura 2).

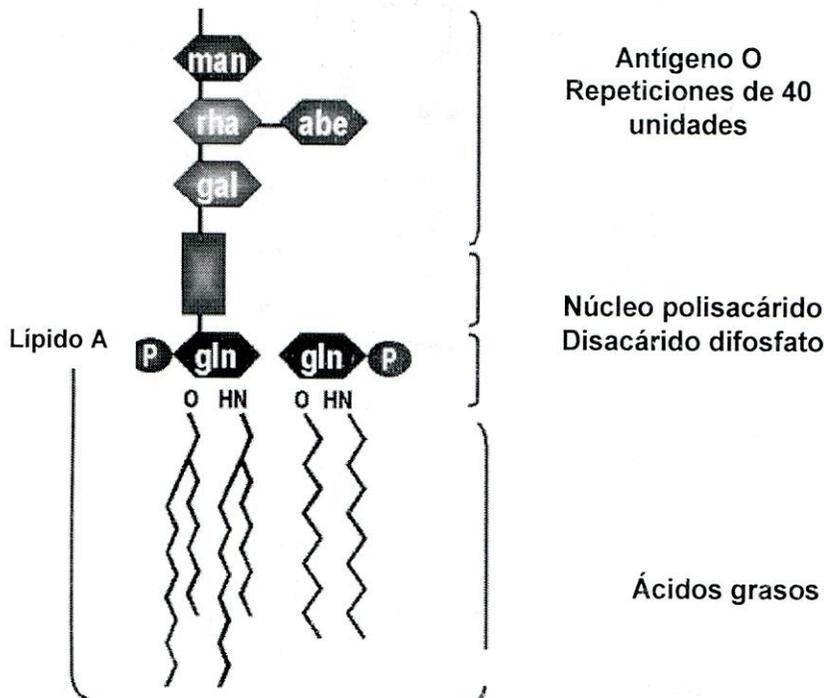


Figura 2. Unidad típica de polisacárido mostrando las diferentes regiones. (Modificado de Swain *et al.*, 2008).

Los animales superiores son extremadamente sensibles a la endotoxina, incluso a dosis bajas, pero vertebrados inferiores como las ranas y los peces son resistentes al choque endotóxico (Berczi *et al.*, 1966 citado por Swain *et al.*, 2008).

Reconocimiento de LPS

En mamíferos, el TLR 4 (por sus siglas en inglés, *toll like receptor*) es el principal componente del complejo receptor (CD14/TLR4/MD2) (receptores CD14 y TLR4 asociados a proteína MD-2) que está relacionado con la activación del sistema inmune por LPS.

El LPS es capaz de unirse a la proteína de unión LBP (por sus siglas en inglés lipopolysaccharide binding protein), la unión se hace específicamente a través

de la estructura endotóxica del LPS denominada lípido A; esta unión a su vez acelera la unión de la endotoxina al receptor CD14 que actúa junto con el complejo TLR4/MD2, resultando en la homodimerización y activación del TLR4 seguido del reclutamiento de las moléculas adaptadoras intracelulares (dentro de las cuáles participan la MyD88, TIRAP, TICAM 1 y TICAM 2), a través de sus dominios TIR, que por último permite la expresión de genes proinflamatorios (Fitzgerald *et al.*, 2004).

Sin embargo, según Ilijev *et al.*, (2005), el complejo CD14/TLR4/MD2 en peces está ausente, así como la LBP y la proteína adaptadora TICAM2, por lo que se explicaría la atenuada sensibilidad a los LPS en peces. Los autores proponen que la respuesta de los leucocitos a los LPS puede estar dado por otras proteínas de unión a membrana como la CD11/CD18, también conocidas como β -integrinas; las proteínas de choque térmico 70 (HSP70), HSP 90, receptores de quimioquina, receptor CXCR4 y el factor de diferenciación 5 (GDF5). Las β -integrinas reconocen la estructuras hidrofílicas expuestas al ambiente de los carbohidratos de los LPS, no la parte hidrofóbica endotóxica (como es el caso de la LBP). Ilijev *et al.*, (2005), hipotetizan la posibilidad que diferentes receptores, incluyendo TLRs, estén relacionados en la activación de los fagocitos mononucleares de peces, a través de las interacciones colaterales con las β -integrinas y la subsecuente transmisión de señales de activación intracelular (Figura 3).

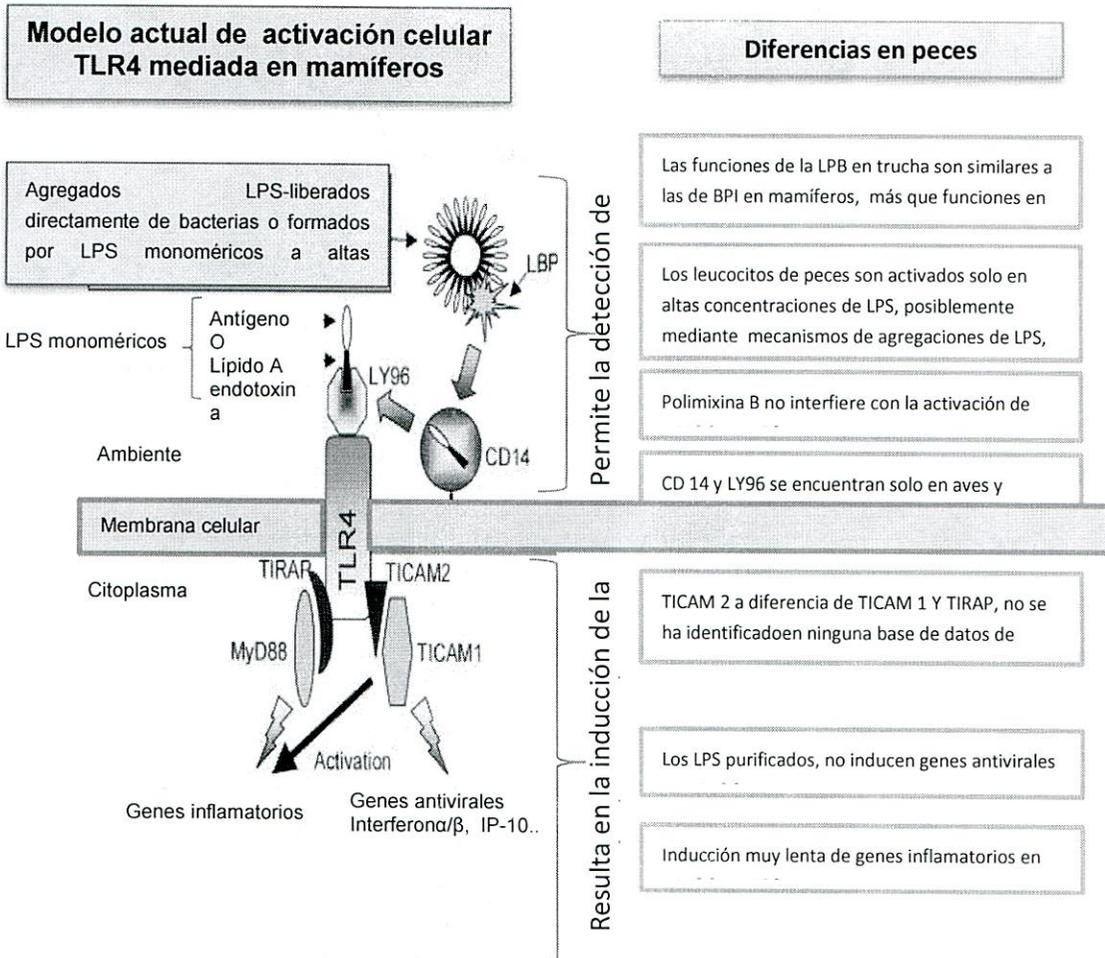


Figura 3. Esquema de las diferencias en entre peces y mamíferos a la respuesta por LPS (Modificado de Iliev *et al.*, 2005).

Efecto de LPS en peces

Los LPS pueden disparar varios componentes inmunes en peces, así como mejorar su sobrevivencia (Swain *et al.*, 2008). Se ha reportado inducción leve de TNF-2 (factor de necrosis tumoral 2) en monocitos de *Oncorhynchus mykiss* (Iliev *et al.* 2005) con LPS de *Escherichia coli*, mejoramiento de la inmunidad y mejoramiento de la sobrevivencia inmunizando carpas comunes con LPS de *A. hydrophila* (Selvaraj *et al.*, 2006). En la tabla 2, se resumen algunos de los trabajos en peces y su efecto sobre componentes inmunes.

BACTERIAS PROBIÓTICAS: *Lactobacillus* sp.

La FAO/WHO (2001), define los probióticos como: “*microorganismos vivos que confieren un efecto fisiológico benéfico sobre el hospedero cuando se administran en cantidades adecuadas*”. Estos microorganismos son capaces de modular muchos aspectos del sistema inmune innato. La mayoría de las bacterias probióticas propuestas para el uso en acuicultura pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Vibrio* y *Bacillus* (Verschuere, 2000).

El género *Lactobacillus* ha sido uno de los géneros más estudiados, pertenece a la microbiota comensal gastrointestinal de humanos y animales, y se encuentra normalmente en alimentos fermentados junto con otras bacterias ácido lácticas (bacterias gram positivas que se caracterizan por fermentar carbohidratos en energía y ácido láctico) (Kekkonen, 2008).

Mecanismo de acción y efecto en peces

El género *Lactobacillus* ha mostrado modular la composición y el metabolismo de la microbiota comensal, la competencia con patógenos incluyendo la inhibición o bloqueo de su adhesión, e inducir la producción de mucina, adicionalmente es capaz de producir compuestos antimicrobianos, como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, ácidos grasos de cadena corta y bacteriocinas que refuerzan la barrera intestinal, ayudan a la regeneración de células epiteliales y al reforzamiento de las uniones estrechas de los enterocitos (Kekkonen 2008; Vásquez *et al.*, 2005). En el caso de los peces alimentados con *Lactobacillus* se ha demostrado protección contra las enfermedades infecciosas de los peces, tales como las causadas por: *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *Edwardsiella tarda* y *Vibrio anguillarum*, (Aly *et al.*, 2008; Balcázar *et al.*, 2006, Nopadon, *et al.*, 2006; Taoka, *et al.*, 2006; Vásquez *et al.*, 2005; Kim y Austin, 2006; Nikoskelainen *et al.*, 2003; Nopadon *et al.*, 2006; Chang y Liu, 2002); colonización del intestino por periodos de tiempo en que se suministra el probiótico y después de hasta tres semanas (Kim y Austin, 2006; Chang y Liu, 2002); mejoramiento de la respuesta inmune,

incrementando la actividad fagocítica, actividad del complemento, explosión respiratoria, expresión de citoquinas, actividad de la lisozima, actividad citotóxica, (Wang *et al.*, 2008; Panigrahi *et al.*, 2007b; Balcázar *et al.*, 2006; Chang y Liu, 2002; Kim y Austin, 2006, Salinas *et al.*, 2006; Taoka *et al.*, 2006; Nopadon *et al.*, 2006; Panigrahi *et al.*, 2005), e interferencia del *Quorum sensing* de bacterias (Nguyen *et al.*, 2008), que se refiere al mecanismo por el cual los miembros de una población bacteriana se comportan cooperativamente, como respuesta a la densidad de la población, de esta manera los probióticos pueden alterar la respuesta estratégica de una población bacteriana patógena, por ejemplo a través de la alteración de patrones de expresión génica de algunos de sus factores de virulencia.

Algunos trabajos se han enfocado en el mejoramiento de parámetros productivos como ganancia de peso, eficiencia de retención de proteína, entre otros, asociando estas propiedades a la actividad de enzimas de las bacterias, que mejoran la utilización de nutrientes en los peces (Saha *et al.*, 2006; Haroun *et al.*, 2006; Yanbo y Zirong, 2006; Wang *et al.*, 2008).

La tabla 3 resume algunos de los trabajos recientes realizados con *Lactobacillus* como probióticos y su efecto tanto *in vitro* como *in vivo* en peces de cultivo. Por otro lado la tabla 4, muestra algunos estudios de la mezcla de diferentes inmunoestimulantes en peces.

Tabla 1. Estudios de β -glucanos como inmunoestimulantes en peces.

Especie	Inmunoestimulante	Fuente	Dosificación y administración	Efecto	Autor
<i>Sparus aurata</i>	<i>S. cerevisiae</i> silvestre y mutante	Silvestre (BMA64-1A); Mutante con inhibición de la β -1,3 glucano sintetasa	Dieta: 10 g cepa/kg alimento alimentado con 10 g (dieta seca)/kilogramo peso diario. Dieta por tres semanas, evaluando parámetros a la 2, 4 o 6 semanas	Cepa mutante: incremento lisozima, fagocitosis, actividad citotóxica y explosión respiratoria Cepa silvestre: aumento de actividad citotóxica y explosión respiratoria (4 semana)	Rodríguez <i>et al.</i> , 2003
<i>Pimephales promelas</i>	β -glucano	β -glucano levadura panadería β -glucano levadura panadería	Dieta: 10 g/kg alimento, alimentando dos veces a saciedad	Incremento en degranulación de neutrófilos en peces no estresados y disminución en peces estresados	Palic <i>et al.</i> , 2006
<i>Cyprinus carpio</i>	β -glucano	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Intraperitoneal a 100, 500 y 1000 μ g/pez en el 1, 3 y 5 día.	Incremento de leucocitos, actividad bactericida y explosión respiratoria. Mayor protección frente a <i>A. hydrophila</i> con dosificación media.	Selvaraj <i>et al.</i> , 2005a
<i>Labeo rohita</i>	β -glucano	Comercial	Dieta: 100 mg β -glucano/Kg alimento; 250 mg β -glucano/Kg alimento; 500 mg β -glucano/Kg alimento.	Incremento de leucocitos, fagocitosis, actividad lisozima, del complemento y actividad bactericida luego de cuarenta y dos días con 250 mg β glucano/kg	Misra <i>et al.</i> , 2006
<i>Danio rerio</i>	β -glucano	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Intraperitoneal: 5, 2, 0,5 mg β -glucano /ml, en día 6, 4, 2 anterior al desafío	Incremento en células monomielocíticas del riñón, mayor actividad bactericida de células de riñón y modulación de la expresión de IFN γ (interferon gama) y quimioquinas. Mejora resistencia con <i>S. Iniae</i>	Rodríguez <i>et al.</i> , 2008



Tabla 1 Continuación. Estudios de β -glucanos como inmunoestimulantes en peces.

Especie	Inmunoestimulante	Fuente	Dosificación y Administración	Efecto	Autor
<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Comercial	Dieta; 0, 50, 100 y 200 mg β -glucano	Los β -glucanos no tuvieron efecto sobre la estimulación de la respuesta de anticuerpos específicos a <i>S. iniae</i> (en animales inmunizados), ni sobre la resistencia a <i>S. iniae</i>	Whittington <i>et al.</i> , 2005
<i>Cyprinus carpio</i>	β -glucano	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Baño: 150, 750, 1500 μ g/ml; dieta: 1, 2, 4% día 1, 3 y 5; e intraperitoneal 100, 500 y 1000 μ g/pez	Intraperitoneal: Incremento sobrevivencia a <i>A. hydrophila</i> , leucocitos, producción de anión superóxido, expresión de IL-1, efecto adyuvante.	Selvaraj <i>et al.</i> , 2005b

Tabla 2. Estudios de efectos *in vivo* de LPS en peces (modificado de Swain *et al.*, 2008).

Especie	Fuente	Dosificación y Administración	Efecto	Autor
<i>Danio rerio</i>	<i>E. coli</i>	Inmersión	Mejora la actividad de citoquinas proinflamatorias	Watze <i>et al.</i> , 2007
<i>Labeo rohita</i>	<i>E. coli</i>	Intraperitoneal 1 EU/pez	Incrementa niveles de lisozima, globulina total, mieloperoxidasa y actividad de explosión respiratoria	Nayak <i>et al.</i> , 2008
<i>Labeo rohita</i>	<i>E. coli</i>	Intraperitoneal 10 EU/pez	Disminuye niveles de lisozima, globulina total, mieloperoxidasa y actividad de explosión respiratoria	Nayak <i>et al.</i> , 2009
<i>G. morhua</i>	<i>A. salmonicida</i>	Dieta y baño	Incrementa la sobrevivencia ante desafío con <i>A. salmonicida</i> .	Konzisca <i>et al.</i> , 2004
<i>Salmo salar</i>	LPS	Baño (0.25% LPS+1%β-glucanos)	Incrementa actividad de lisozima en riñón craneal, intestino de macrófagos y células polimorfonucleares	Paulsen <i>et al.</i> , 2003
<i>Sparus aurata</i>	<i>E. coli</i>	Baño	Incrementa actividad antiproteasa. Mejora protección contra <i>Photobacterium damsela</i>	Hanifetal <i>et al.</i> , 2005
<i>Salmo salar</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Inmunización	Mejora el nivel de anticuerpos específicos	Albut <i>et al.</i> , 1998
<i>Salmo salar</i>	LPS	<i>In vivo</i>	Mejora fagocitosis, actividad pinocitosis, producción de anión superóxido intracelular	Baba <i>et al.</i> , 1988
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Intraperitoneal 50 µg/pez	Incrementa la titulación de anticuerpos que persisten hasta por 2-4 semanas	Nakhla <i>et al.</i> , 1997

Tabla 3. Estudios de *Lactobacillus* como probióticos en peces (recopilación de la autora).

Especie	Cepa	Fuente	Dosificación y Administración	Efecto	Autor
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Laboratorio	Dieta	Incremento de anión superóxido por leucocitos del riñón cefálico y actividad del complemento. Sobre-regulación genes expresan IL 1 β , TNF, y TGF en bazo y riñón cefálico	Panigrahi <i>et al.</i> , 2007
<i>Sparus aurata</i>	<i>L. delbrückii</i>	<i>Sparus aurata</i>	Dieta	Incremento en actividad citotóxica y el mantenimiento de fagocitosis luego de tres semanas de alimentación.	Salinas <i>et al.</i> , 2008
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>L. sakei</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Dieta	Incremento de actividad fagocítica de <i>Aeromonas salmonicida</i> , mayor incremento con <i>L. lactis</i> spp.	Balcázar, <i>et al.</i> , 2006
<i>Sparus aurata</i>	<i>L. fructivorans</i>	<i>Sparus aurata</i>	Dieta con alimento vivo y pellet	Incremento número de células Ig+ y granulocitos acidófilos	Picchiatti <i>et al.</i> , 2007
	<i>L. plantarum</i>	Heces humanas			
<i>Sparus aurata</i>	<i>L. delbrückii</i> subsp. <i>Lactis</i>	Laboratorio	Dieta con cepas inactivadas	Cepas poseen buenas propiedades inmunoestimulantes in vitro, Pdp11 tuvo efecto más débil sobre la respuesta innata. Dosis altas (5×10^7 CFU/g) promueven estimulación parámetros de la respuesta inmune innata.	Salinas <i>et al.</i> , 2006
<i>Scophthalmus maximus</i>	<i>L. acidophilus</i>	Leche		Incrementa resistencia a <i>Vibrio splendidus</i> , <i>V. pelagius</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>Carnobacterium piscícola</i> .	Vásquez, <i>et al.</i> , 2005
	<i>L. brevis</i>	Cerveza			
	<i>L. casei</i> ssp. <i>Casei</i>	Queso	<i>Scophthalmus maximus</i>		
	<i>L. delbrückii</i> ssp. <i>lactis</i>	Carne fermentada			
	<i>L. helveticus</i>	Queso gruyer			

Tabla 3. Continuación. Estudios de *Lactobacillus* como probióticos en peces (recopilación de la autora).

Especie	Cepa	Fuente	Dosificación y Administración	Efecto	Autor
<i>Scophthalmus máximos</i>	<i>L. plantarum</i>	Ensilado de pasto		Incrementa resistencia a <i>Vibrio splendidus</i> , <i>Vibrio pelagius</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>Carnobacterium piscicola</i> .	Vásquez <i>et al.</i> , 2005
	<i>L. lactis ssp. Lactis</i>	Leche	<i>Scophthalmus maximus</i>		
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Embutidos			
	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Carne curada			
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>L. rhamnosus</i>	Humano	Dieta	Incrementa resistencia a <i>Aeromona salmonicida</i>	Nikoskelainen <i>et al.</i> , 2003
<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	LAB	Dieta	Incrementa resistencia a <i>E. tarda</i> , actividad fagocítica y actividad del complemento por vía alterna y prevención de necrosis tímica.	Nopadon <i>et al.</i> , 2006
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>L. rhamnosus</i>	LAB	Dieta	Incremento de actividad fagocítica y de complemento con forma activa. Incremento de inmunoglobulina solo durante alimentación.	Panigrahi <i>et al.</i> , 2005
<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Comercial	Dieta	Incrementa niveles de lisozima, migración de neutrófilos y actividad bactericida del plasma. Mejor resistencia a <i>Edwardsiella tarda</i> .	Taoka, <i>et al.</i> , 2006

Tabla 4. Estudio *in vivo* del efecto de mezclas de componentes microbianos, administrados por diferentes vías.

Especie	Inmunoestimulante	Fuente	Dosificación y Administración			Efecto	Autor
			Intraperitoneal (IP)	Baño	Dieta		
<i>Cyprinus carpio</i>	β-glucano y LPS	LPS de <i>A. hydrophila</i>	100 μg β-glucano + 10 μg LPS/pez	100 μg β-glucano + 10 μg LPS/ml x 90 min	0.1% β-glucano + 0.025 LPS	Incremento de monocitos y neutrófilos, anión superóxido, efecto adyuvante. Mejora la resistencia a <i>A. hydrophila</i> (intraperitoneal y oral)	Selvaraj et al., 2006
			500 μg β-glucano + 50 μg LPS/pez	500 μg β-glucano + 50 μg LPS/ml x 90 min	0.5% β-glucano + 0.125% LPS/pez		
			1000 μg β-glucano + 100 μg LPS/pez	1000 μg β-glucano + 100 μg LPS/ml x 90 min	1% β-glucano + 0.25% LPS/pez		
		β-glucano de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Inyección día 7, 14, 28	Baño en día 7, 14, 28	Dieta mañana y tarde en día 1, 7, 14		

PERSPECTIVAS Y CONCLUSIONES

El uso de inmunoestimulantes en piscicultura posee un gran potencial como herramienta de manejo sanitario. Han despertado gran interés porque se caracterizan por tener un modo de acción generalizado, capaces de aumentar la respuesta inmunitaria específica, respondiendo ante varios microorganismos patógenos y pudiéndose utilizar de manera profiláctica. Sin embargo, actualmente, el sector productivo se encuentra ante una gran oferta de sustancias o productos para mejorar las condiciones sanitarias de los sistemas, esto sin respaldo técnico ni rigor científico..

Por esta razón se hace necesario la realización de trabajos acerca de cada una de las sustancias de interés para poder definir cuál es la respuesta que generan en el sistema inmune innato; trabajos que se pueden extrapolar de estudios previos en especies similares adecuando metodologías para la evaluación en condiciones locales, en donde estos trabajos puedan responder acerca de cuáles serían las cantidades y tiempos adecuados de suministro para mantener la respuesta inmune apropiada, ya que se ha visto que el suministro permanente y dosis muy elevadas de sustancias inmunoestimulantes, pueden tener incluso efectos adversos sobre la salud de los peces; también se requiere la realización de trabajos que pongan a prueba el grado de protección de las sustancias ante un patógeno determinado, a través de infecciones experimentales, evaluando la supervivencia de los peces como parámetro más acertado de la respuesta de todo el organismo. Adicionalmente, es de apuntar las diferencias intraespecíficas de los peces dentro de los estudios, por lo cuál estos, deben dirigirse a cada una de las especies de interés.

Aunque existen en la actualidad una gran cantidad de trabajos acerca del efecto benéfico de probióticos e inmunoestimulantes en el mundo, poco se ha hecho en nuestra región, esto aunado a que varias sustancias inmunoestimulantes evaluadas

con rigor científico, sonde alto costo y difícil consecución, se requeriría apoyo gubernamental para tal propósito. Se propone así el uso de sustancias evaluadas que puedan extraerse y producirse de manera industrial sin afectar gravemente los costos de producción, sustancias que puedan incluirse en el pienso, para facilitar el proceso de asimilación sin inducir la manipulación y estrés de los animales. De esta manera constituir a los inmunoestimulantes como una estrategia preventiva tecnológicamente viable a futuro para el incremento de la capacidad de respuesta inmune de los peces, reduciendo así los problemas sanitarios y pérdidas económicas en los sistemas de cultivo de nuestra región.

BIBLIOGRAFÍA

Aly S, Ahmed Y, Ghareed A, Mohamed M. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish Shellfish Immunol* 2008; 25: 128-136.

Balcazar J, Vendrell D, de Blas I, Ruiz I, Girones O, Muzquia J. Immune modulation by probiotic strains: quantification of phagocytosis of *Aeromonas hydrophila* by leukocytes isolated from gut of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using a radiolabelling assay. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2006; 29: 335-343.

Brown G, Gordon S. Fungal β -glucans and mammal immunity. *Immunity* 2003; 19:311-315.

Chang C, Liu W. Short Communication: An evaluation of two probiotic bacterial strains, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for reducing edwardsiellosis in cultured European eel, *Anguilla anguilla* L. *J Fish Dis* 2002; 25: 311–315.

Dalmo R, Bøgwald J. β -glucans as conductors of immune symphonies. Review. *Fish Shellfish Immunol* 2008; 25:384-396.

FAO. Informe del 28º período de sesiones del Comité de Pesca. Roma, 2-6 de marzo de 2009. *FAO Informe de Pesca y Acuicultura*. No. 902. Roma, FAO. 2009. 64p.

FAO/WHO. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. 2001, Cordoba, Argentina.

Fitzgerald K, Rowe D, Golenbock D. Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD-2 complex. *Microbes Infect* 2004; 6:1361–1367.

Fuller, R. A review: probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 1989;66:365–378.

Haroun E, Goda A, Chowdhury K. Effect of dietary probiotic Biogens supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture research*. 2006; 37: 1473-1480.

Iliev D, Roach J, Mackenzie S, Planas J, Goetz F. Endotoxin recognition: *In fish or not in fish?*. *FEBS Lett* 2005; 579(29): 6519–6528.

Kapetsky JM., Nath SS. Una evaluación estratégica de la potencialidad para la piscicultura dulceacuícola en América Latina. FAO. 1997

Kekkonen R. Immunomodulatory Effects of Probiotic Bacteria In Healthy Adults. Academic Dissertation. Institute of Biomedicine, *Department of Viral Diseases and Immunology* 2008. Helsinki, Finland.

Kim D, Austin B. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish Shellfish Immunol* 2006; 21:513-524.

Madigan M, Martinko J, Dunlap P, Clark D. Brock, *Biología de los microorganismos*. Addison Wesley 2009. 12 edición. P1259.

Mantovani M, Bellini M, Angeli J, Oliveira R, Silva A, Ribeiro L. β -Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. *Mutation Res* 2008; 658:154–161

Martínez M, Devia A, Ospina A, Reyes C, Villamil L. Nuevos indicios sobre La idoneidad de los géneros *Bacillus* y *Lactobacillus* como probióticos en el cultivo de tilapia nilótica. Resúmenes de trabajos presentados Nutrición y Alimentación. Memorias: IV Congreso Colombiano de Acuicultura “Comercialización y Potencial de Mercadeo de los Recursos Acuícolas”. *Rev Col Cien Pec* 2008b; 21(3):493-494.

Martínez M, Devia A, Ospina A, Reyes C, Villamil L. Relación entre el uso de *Bacillus* y *Lactobacillus* y el nivel de sobrevivencia de tilapia nilótica durante desafíos experimentales con bacterias patógenas. Resúmenes presentados patología y sanidad acuícola. Memorias: IV Congreso Colombiano de Acuicultura “Comercialización y Potencial de Mercadeo de los Recursos Acuícola. *Rev Col Cien Pec* 2008a; 21(3):.499.

Misra C, Mukherjee S, Pattnaik P. Effect on long term administration of dietary β glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita*. *Aquaculture* 2006; 255: 86-94.

Nguyen T, Dierckens K, Sorgeloos P, Bossier P. A Review of the Functionality of Probiotics in the Larviculture. *Food Chain Mar Biotech* 2008; 10:1–12.

Nikoskelainen S, Ouwehand A, Bylund G, Salmien S, Lilius E. Immune Enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*).. *Fish Shellfish Immunol* 2003; 15:443-452.

Nopadon P, Kobayashi T, Katagiri T, Maita M, Endo M. Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against

experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Vet Immunol Immunopathol* 2006; 113:339–347.

Oficina de Prensa – FAO. 21 países lanzan la Red de Acuicultura de las Américas con apoyo técnico de FAO. Santiago de Chile, 26 de marzo de 2010. Disponible en internet: www.rlc.fao.org/es/prensa/coms/2010/34.pdf

Palic D, Andreasen C, Herolt D, Menzel B, Rot J. Immunomodulatory effects of β -glucan on neutrophil function in fished minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). *Dev Comp Immunol* 2006; 30:817–830.

Panigrahi A, Kiron V, Satoh S, Hirono I, Kobayashi T, Sugita H, Puangkaew J, Aoki T. Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding. *Dev Comp Immunol* 2007 31:372–382.

Panigrahi A, Kirona V, Puangkaewa J, Kobayashib J, Satoha S, Sugita H. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 2005, 243:241–254.

Picchietti S, Mazzini M, Tadde A, Renna R, Fausto A, Mulero V, Carnevali O, Cresci A, Abelli L. Effects of administration of probiotic strains on GALT of larval gilthead seabream: Immunohistochemical and ultrastructural studies. *Fish & Shellfish Immunol* 2006; 1-11

Raa, J. The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds. En: Cruz - Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R, (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, Mexico.

Rodríguez A, Cuesta A, Ortuño J, Esteban MA, Meseguer J. Immunostimulant properties of a cell wall-modified whole *Saccharomyces cerevisiae* strain administered by diet to seabream (*Sparus aurata* L). *Vet Immunol Immunopathol* 2003a; 96:183-192.

Rodríguez F, Esteban M, Meseguer J, Bravo M, Gómez G, Rojas-Luna T, Jiménez G, Balcázar J. Estrategias de control de enfermedades en Acuicultura II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura CIVA 2003b (<http://www.civa2003.org>), 624-654.

Rodríguez I, Chamorro I, Novoa B, Figueras A. β -Glucan administration enhances resistance and some innate immune responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Shellfish Immunol* 2008; 25:731-739.

Rondón I. Inmunoestimulantes en Medicina Veterinaria. *Revista Orinoquia* 2004; 8 (2).

Saha S, Narayan R, Sukanta R, Sen K, Kumar A. Characterization of cellulase-producing bacteria from the digestive tract of tilapia, *Oreochromis mossambica* (Peters)..and grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes)..*Aquaculture Res* 2006; 37:380-388.

Sahoo P. Role of immunostimulants in disease resistance of fish. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 2007;(2): 45.

Salinas I, De Blas I, Ruiz I, Vendrell D, Evora M, Muzquiz J. Growth inhibition of *Aeromonas* species by lactic acid bacteria isolated from salmonids. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2006a, 18 (1): 61-63.

Salinas I, Díaz-Rosales P, Cuesta A, Meseguer J, Chabrilón M, Moríñigo A, Esteban M. Effect of heat-inactivated fish and non-fish derived probiotics on the innate immune parameters of a teleost fish (*Sparus aurata* L.). *Vet Immunol Immunopathol* 2006b; 111:279–286.

Salinas I, Myklebust R, Esteban M.A, Olsen R. Meseguer J, Ringø E. In vitro studies of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). foregut: Tissue responses and evidence of protection against *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* epithelial damage. *Vet Microbiol* 2008; 128:167–177

Selvaraj V, Sampath K, Sekar V. Adjuvant and Immunulatory effect of β -glucan administration in combination with LPS enhances survival and some immune parameters in carp challenge with *A. hydrophila*. *Vet Immunol Immunopathol* 2006; 114:15-24.

Selvaraj V, Sampath K, Sekar V. Use of glucan from *Saccharomyces cerevisiae* as an immunostimulant in carp: impact on hematology, phagocyte function, and infection with *Aeromonas hydrophila*. *Israeli J Aquaculture* 2005a; 57(1):39-48.

Selvaraj V, Sampath K, Sekar V. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*).infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol* 2005b; 19:293-306.

SOFIA. Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura - 2008. FAO - Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, 2009.

Swain P, Nayak S, Nanda P, Dash S. Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin). in fish: A review. *Fish Shellfish Immunol* 2008; 25:191-201.

Taoka Y, Maeda H, Jo J, Kim S, Park S, Yoshikawa T, Sakata T. Use of live and dead probiotic cells in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fisheries Sci* 2006; 72: 755–766.

Tizard I. *Veterinary Immunology*. Eight Edition. Saunders Elsevier. 2009. Texas.

Vásquez, J. González M, Murado M. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture* 2005; 245:149-161.

Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol Mol Rev* 2000; 64:655–671.

Volman J, Ramakers J, Plat J. Dietary modulation of immune function by β -glucans. *Physiol Behav* 2008; 94: 276-284.

Wang Y, Zi-Qiang T, Jiang-Tao Y, Wei-Fen Li. Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*). growth performance and immune response. *Aquaculture* 2008; 277(3-4): 203-207.

Whittington R, Lim C, Klesius P. Effect of dietary β -glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 2005; 248:217-225.

Yanbo W, Zirong X. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*). based on growth performance and digestive enzyme activities. *AFST* 2006; 127:283–292.

CAPITULO II

EFFECTO DE MEZCLAS EXPERIMENTALES DE *Lactobacillus sp.*, LPS Y β -GLUCANOS SOBRE PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS, ANATOMOPATOLÓGICOS Y DE EXPLOSIÓN RESPIRATORIA EN TILAPIA HÍBRIDA

Vásquez-Piñeros MA¹

¹Bióloga Marina, Esp. cMSc. Grupo de Investigación en Sanidad de Organismos Acuáticos, IALL.

Email: mandreavasquez@gmail.com

RESUMEN

Para la obtención y selección de los inmunoestimulantes experimentales, se extrajeron LPS de cepas de *Escherichia coli* ATCC 31617, y β -glucanos provenientes de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* mediante dos técnicas que permitieran el mejor rendimiento. Para la selección de bacterias probióticas, se probaron seis cepas de *Lactobacillus sp.*, en lo que concierne al potencial probiótico, como: ensayo de antagonismo *in vitro* a *Aeromonas hydrophila*, tolerancia a diferentes pH, tolerancia a diferentes temperaturas, adicionalmente, se evaluó la viabilidad de la bacteria durante los procesos de inclusión en el pienso. Posterior a la elaboración de las mezclas inmunopotenciadoras y la evaluación de los procesos de extracción de compuestos e inclusión en alimento, se realizó la evaluación *in vivo* en alevinos de tilapia híbrida, utilizando tres mezclas diferentes de inmunoestimulantes (β -glucanos y LPS; *Lactobacillus sp.*, y LPS; *Lactobacillus sp.* y β -glucanos) en las dietas que fueron suministrados durante cuatro semanas. Durante este periodo se monitorearon parámetros hematológicos (porcentaje de hematocrito y recuento diferenciales leucocitos), actividad de explosión respiratoria de neutrófilos y la evaluación anatomopatológica para observar el estado de salud

de los peces. La cepa ácido láctica *Lactobacillus casei*, mostró las mejores características probióticas *in vitro*, (mejor tolerancia a pH y temperaturas y antagonismo con *A. hydrophila*), además de una apropiada viabilidad en el alimento. Durante la evaluación *in vivo*, los valores de reducción de azul de tetrazolio nitrado NBT de fagocitos de peces alimentados con β -glucanos y *Lactobacillus casei*, así como LPS y *Lactobacillus casei*; fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) que el tratamiento control durante la segunda semana de alimentación, el porcentaje de linfocitos con estas dietas fue mayor en la tercera semana ($p < 0.05$). En el tratamiento con suplemento de LPS y *Lactobacillus casei* los porcentajes de neutrófilos disminuyeron significativamente durante la segunda y tercera semana de suministro, con respecto al grupo control ($p < 0.05$). La dieta con β -glucanos y *Lactobacillus casei* suministrado a la segunda semana, mostró mayor incremento de leucocitos y mayor activación de CMM del bazo de los peces. Se comprobó la inocuidad de las sustancias LPS y β -glucanos y la bacteria láctica utilizada como inmunopotenciadora través del examen anatomopatológico. Por último dietas con las mezclas de *L. casei* con LPS y *L. casei* con β -glucanos, presentaron mayor activación de centros melanomacrófagos (CMM). El incremento en los valores de explosión respiratoria, porcentaje de linfocitos, y activación de CMM mostraron que esta mezcla de inmunostimulantes con *L. casei* y β -glucanos, suministrada por dos semanas, fue la mejor para la evaluación del efecto protector contra *Aeromonas hydrophila* que se describe en el tercer y último capítulo.

Palabras clave: β -glucanos, LPS, *Lactobacillus casei*, explosión respiratoria, recuento de leucocitos, sistema inmune innato

ABSTRACT

For Getting and selecting experimental immunostimulants, LPS were extracted from *Escherichia coli* ATCC 31617 strain, and β -glucans from *Saccharomyces cerevisiae* yeast, through two techniques that allowed the best yield; for selecting probiotics, parallelly, six strains of *Lactobacillus* sp., were taken for making phenotypic and

potential probiotics test, such as: *in vitro* antagonist test, surviving different pH test, different bilis concentration and different temperature test, additionally, the viability of bacteria in feed was tested at the beginning and through the experimental period. After extraction and evaluation of bacteria viability, the *in vivo* evaluation of fry of hybrid tilapia, using three different immunostimulants (β -glucans and LPS; *Lactobacillus sp.*, and LPS; *Lactobacillus sp* and β -glucans) in diet, feeding during four weeks, was made. During this period the hematological parameters (hemotocrit and leukocytes differential count), respiratory burst activity of neutrophils, an anatomopathologic evaluation, were monitored to see the health fish status. The lactic acid strain *Lactobacillus casei*, sowed the best probiotic characteristically of potential probiotics *in vitro* (pH, temperature tolerance and antagonism against *Aeromonas hydrophila*), besides a good viability in feed. During *in vivo* evaluation, NBT values of fish feed with β -glucans with *Lactobacillus casei* and LPS with *Lactobacillus casei*, were significantly higher ($p < 0.05$) that control group, during second week of feeding, the lymphocytes percentage with these diets were higher in the third week ($p < 0.05$). The treatment with LPS and *Lactobacillus casei*, showed percentages of neutrophils significantly lower during the second and third week, that control group ($p < 0.05$). β -glucans and *Lactobacillus casei* diets during two weeks, showed the best increase and activation of the defense cell of the organism. The harmlessness of substances and bacteria were probed through anatomopathological examination. At last, diets with *L. casei* with β -glucans, present the best melonomacrophage centers (MMC) activation, this sum to burst respiratory and lymphocytes values, showed that this mix was the best for the protect effect against *Aeromonas hydrophila* evaluation that is described in the third and last chapter.

Key words: β -glucans, LPS, *Lactobacillus casei*, respiratory burst, leukocytes count, innate immune system

INTRODUCCIÓN

El crecimiento de los últimos años del cultivo de la tilapia híbrida, como la principal especie de cultivo del país, posicionada así por los grandes volúmenes de producción (27.953 toneladas por año) (FAO, 2006), estuvo acompañado de una mayor intensificación de los sistemas de cultivo de esta especie, y la presentación de una considerable presión sobre estos sistemas de cultivo, por tal razón la tilapia híbrida en Colombia, se ha convertido en una de las especies más afectadas por infecciones por *Aeromonas* spp., *Edwardsiella* spp. y *Streptococcus* spp. (Rey, 2002). Así el uso de fármacos, especialmente antibióticos en el manejo sanitario de los sistemas de cultivo se ha convertido en una práctica común entre los piscicultores, lo que ha conllevado a la generación de bacterias resistentes y eliminación de bacterias benéficas, limitando su competencia con microorganismos patógenos.

Para poder mantener el patrón de crecimiento de los sistemas piscícolas de tilapia del país de manera competitiva y sostenible, será necesario el desarrollo de herramientas sanitarias más allá del uso de antibióticos y quimioterapias para el control de enfermedades. Desde hace varias décadas, los inmunoestimulantes se han propuesto como una alternativa para mejorar el estado de salud tanto de humanos como de animales, utilizándose actualmente para el control y prevención de enfermedades. De la misma forma, su uso se ha trasladado al área productiva piscícola con diversas investigaciones que evidencian resultados positivos sobre la estimulación del sistema inmune, protección contra patógenos y mejoramiento de parámetros productivos.

Por otro lado es importante tener en cuenta la evaluación de sustancias que a futuro puedan estar al alcance de sector productivo, es decir que sean de fácil adquisición, que no incrementen sustancialmente los precios y sobre todo que puedan suministrarse sin inducir la manipulación y estrés de los animales, una manera adecuada sería por ejemplo a través de suplementos dietarios que puedan

permanecer dentro del pellet. Aunado a esto se requiere, la evaluación de la evaluación *in vitro* para determinar el potencial inmunoestimulante, e *in vivo*, que permitan evaluar la inocuidad, y la respuesta sobre los parámetros inmunes innatos, que en el caso del presente trabajo se enfocó en la respuesta de leucocitos de la sangre periférica. De esta manera proponer el uso de sustancias que incrementen la respuesta del sistema inmunitario y por tanto puedan también incrementar la resistencia a enfermedades de importancia en piscicultura.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar y comparar el desempeño de mezclas inmunoestimulantes de β -glucanos, *Lactobacillus sp* y LPS, suministradas en la dieta sobre la inocuidad de las sustancias sobre los peces y los parámetros inmunes y estado de salud de alevinos de tilapia híbrida *Oreochromis sp.*, a través de la evaluación parámetros fagocitarios, hematológicos y evaluación anatomopatológica. Realizando previamente trabajos *in vitro* para el establecimiento de técnicas de extracción de LPS y beta-glucanos y selección de probióticos viables para la incorporación en el alimento de peces.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar y comparar el desempeño de mezclas inmunoestimulantes suministradas en la dieta sobre parámetros inmunes y estado de salud de la tilapia híbrida *Oreochromis sp.*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar técnicas de extracción de LPS y beta-glucanos y selección de bacterias probióticas viables para la incorporación en el alimento de peces.

Monitorear parámetros fagocitarios y hematológicos de peces alimentados con y sin suplementos inmunoestimulantes.

Monitorear el estado de salud a través de la evaluación anatomopatológico de peces con y sin suplemento inmunoestimulante.

METODOLOGÍA

Localización y descripción del área del estudio

La investigación se llevó a cabo en los Laboratorios de Bioensayos del Instituto de Acuicultura (IALL) y de Microbiología Veterinaria de la Universidad de los Llanos, ubicados en la ciudad de Villavicencio, Meta; y en el Laboratorio de Microbiología Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia, localizado en la ciudad de Bogotá D.C.

Preparación de inmunoestimulantes

Los inmunoestimulantes a evaluar en las dietas fueron: lipopolisacáridos, β -glucanos y *Lactobacillus sp.*, obtenidos del cepario del Laboratorio de la Universidad Nacional de Colombia. Los inmunoestimulantes se trasladaron del Laboratorio de Microbiología Veterinaria de la Universidad Nacional al Instituto de Acuicultura de los Llanos, manteniéndose a una temperatura no menor a 4°C.

Lipopolisacáridos (LPS): El LPS se extrajo de cepas de *E. Coli* ATCC 31617, donada por la Dra. Judith Figueroa, Laboratorio Microbiología Veterinaria de la Universidad Nacional, mediante dos técnicas: la técnica fenol-agua caliente (Westphal y Jann, 1965) y mediante la técnica butanol-agua (Morrison y Leive, 1975), a excepción de los procesos de purificación, para seleccionar la técnica de mejor rendimiento.

Obtención de biomasa bacteriana para LPS: Para realizar cada una de las técnicas de extracción, se obtuvo la biomasa bacteriana a través de siembras de la bacteria *Escherichia coli*, en tubos de vidrio con 6ml de caldo BHI incubado a 37°C por 24 horas, cumplido este tiempo se centrifugó a 4000 rpm por treinta minutos y el pellet se resembró en frascos tapa rosca de capacidad 100 ml con 60 ml de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*), incubando bajo las mismas condiciones. Luego de la incubación, la suspensión bacteriana se centrifugó a 4000 rpm por treinta minutos,

realizando tres lavados seriados con solución salina. Se determinó el peso húmedo de la bacteria mediante pesaje en balanza analítica y la biomasa final se resuspendió en 300 ml de SSFE (solución salina fisiológica estéril), se adicionó timerosal en concentración 0.1% para la inactivación y conservación de las cepas bacterianas. La solución fue refrigerada a 4°C por 24 horas (Jimenez, 2002).

Técnica Fenol-Agua caliente: La mitad de la suspensión obtenida anteriormente, fue de nuevo centrifugada a 4000 rpm por treinta minutos y re-suspendida en 100 ml de agua destilada precalentada a 68°C, adicionando el mismo volumen de fenol al 90%, la mezcla se mantuvo en baño maría con agitación constante por 30 minutos, se refrigeró a 4°C por 24 horas, posteriormente se centrifugó a 4000 rpm por 60 minutos y se separó la fase acuosa, interfase fenólica del precipitado; a las dos primeras fases se le adicionaron etanol al 95% en proporción 1:10 (LPS:etanol), se refrigeró a -20°C por 18 horas, la solución luego se ultracentrifugó a 32000 rpm por tres horas, se retiró el sobrenadante, recuperando el sedimento, que se depositó en vasos Beacker estériles para someterlo a desecación en estufa a 40°C, durante dos días para obtener el peso del extracto seco (Westphal y Jann, 1965).

Técnica de butanol agua: A la mitad de la suspensión restante del proceso de recolección de biomasa bacteriana, se le adicionó un volumen igual de agua saturada de 1-butanol, mezclando por cinco minutos. La mezcla se centrifugó a 4000 rpm, durante 20 minutos, a 4°C. La fase acuosa más baja fue recuperada y almacenada; la fase butanólica y el precipitado insoluble se extrajeron dos veces más, con la mitad del volumen inicial de SSFE para cada extracción. Los extractos acuosos combinados de las tres extracciones fueron centrifugados para remover cualquier material insoluble. Posteriormente se adicionó una cantidad similar de etanol al 98% a cada extracto, para precipitar los LPS; procedimiento llevado a cabo por 24 horas a -20°C. Una vez el LPS se precipitó, se procedió a centrifugar a 4000 rpm durante quince minutos, eliminando sobrenadante y recuperando el sedimento que se depositó en vasos Beacker estériles para someterlo a desecación en estufa

a 40°C, durante dos días para obtener el peso del extractocrudo seco (Morrison y Leive, 1975).

β-Glucanos: Los β-glucanos se extrajeron de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* comercial de panadería, según la metodología de Northcote (1952). La levadura completa se dispersó en 15 ml del 3% (peso/volumen) de NaOH acuoso y se calentó a 100°C por seis horas. Se centrifugó a 4000 rpm por treinta minutos descartándose el sobrenadante. El residuo insoluble se extrajo consecutivamente con NaOH al 3% a 100°C por seis horas, posteriormente se adicionó ácido acético 0.5 N y se calentó por seis horas a 75°C. Finalmente se lavó con etanol y éter proporción (1:1). El sedimento que se depositó en vasos Beacker estériles para someterlo a desecación en estufa a 40°C, durante dos días para obtener el peso del extracto crudo seco.

Control de esterilidad: Tanto a los precipitados de LPS crudos obtenidos mediante ambas técnicas, como a los beta-glucanos extraídos, se le tomaron muestras para siembra en agar BHI y agar Saboreaud, incubando a 37 y 28°C, respectivamente durante ocho días, observando si había crecimiento de bacterias, levaduras y hongos.

Potencial probiótico *Lactobacillus sp.*

Se tomaron siete cepas de *Lactobacillus sp.*, del cepario del laboratorio de la Universidad Nacional, cultivadas en agar MRS, se realizó tinción de Gram, prueba de catalasa y se realizaron pruebas de potencial probiótico: ensayo de antagonismo *in vitro*, tolerancia a diferentes pH, tolerancia a diferentes temperaturas (Verdenelli *et al.*, 2009; Klayraung *et al.*, 2008; Mishra y Prasad, 2005; Vinderola y Reinheimer, 2003; Cai *et al.*, 1999, Alyet *al.*, 2008).

Todas las pruebas *in vitro* se realizaron por duplicado y a la cepa escogida por su potencial probiótico se le realizó el perfil de fermentación del Kit API 50 CHL®, para la identificación de *Lactobacillus*.

Ensayo de antagonismo *in vitro* con *Aeromonas hydrophila*. Para este ensayo se utilizó la cepa de *A. hydrophila* AhTiAi09-44 aislada de tilapias e identificada previamente mediante pruebas bioquímicas y moleculares, donación del Laboratorio de Patobiología Veterinaria de la Universidad Nacional. La bacteria se mantuvo congelada en viales de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) con glicerol al 20% a -20°C, hasta su uso.

Se sembró 20 µl de a solución bacteriana de la cepa láctica (crecida previamente durante 24 horas en caldo BHI), en forma de punto en agar TSA, se incubó a 48 horas por 37°C. Se preparo un agar blando compuesto por caldo TSA con adición de 0.7% agar bacteriológico con 5% del cultivo fresco de *A. hydrophila*, luego del crecimiento del punto, se adiciono la solución del agar blando sobre el agar TSA, se incubó a 30°C por 24 horas. La inhibición se registró midiendo la ausencia del crecimiento del patógeno alrededor del punto (Aly *et al.*, 2008). A las cepas lácticas con antagonismo positivo, se les realizó pruebas de tolerancia a diferentes pH.

Tolerancia a diferentes pH. Las cepas seleccionadas se sometieron a una evaluación de tolerancia a diferentes pH, para esto se prepararon soluciones salinas estériles con niveles de pH de 4 y 7,5, ajustando el pH con HCL y NaOH 1N, las soluciones se mantuvieron refrigeradas hasta su uso. 1 mililitro de una suspensión bacteriana de *Lactobacillus* 0,5 Mc Farland, se le adicionó a nueve mililitros de cada solución de pH y se llevo a incubar a 37°C por tres horas. Tanto inmediatamente después de colocar la suspensión bacteriana en el tubo (concentración inicial), como después del tiempo de incubación (concentración final), se tomo 0.1 mililitro de la mezcla para realizar diluciones seriadas 1:10, las diluciones fueron vertidas en agar MRS para la determinación de células viables luego de 48 horas de incubación. Las pruebas se realizaron por duplicado. La tasa de sobrevivencia se calculó dividiendo el número final sobre el número inicial de colonias crecidas en el agar y multiplicando por cien (Verdenelli *et al.*, 2009).

Tolerancia a diferentes temperaturas. A las cepas seleccionadas con antagonismo positivo y mejor tolerancia a pH, se les realizaron pruebas de tolerancia a elevadas temperaturas, en donde se tomó un mililitro de una suspensión bacteriana seleccionada 0,5 Mc Farland en 9 ml de solución salina estéril, la mezcla se colocó a incubar 9 ml del inoculó a 37°C y otros 9 ml del inóculo a 45°C en baño de María. Luego de un periodo de incubación de tres horas, se determinó el porcentaje de sobrevivencia, a través del conteo en placa por diluciones seriadas como se describió arriba.

Dietas experimentales

Las dietas experimentales contuvieron la cantidad basada en los estudios del efecto de la inclusión de LPS y β -glucanos en la dieta en carpas infectadas con *A. hydrophila* (Selvaraj *et al.*, 2006; Selvaraj *et al.*, 2005a; Selvaraj *et al.* 2005b, Selvaraj *et al.*, 2009), y las dosis del uso de *Lactobacillus* sp., como probiótico en tilapia (Aly *et al.*, 2008; Taoka *et al.*, 2006).

Dieta control:	Alimento comercial (AC)
Dieta experimental 1:	AC con 0.25% de LPS + 1% de β -glucanos
Dieta experimental 2:	AC con 1% de β -glucanos + $\geq 10^7$ UFC/ gr en alimento de <i>Lactobacillus casei</i> .
Dieta experimental 3:	AC con 0,25% de LPS + $\geq 10^7$ UFC/ gr en alimento de <i>Lactobacillus casei</i> .

Viabilidad del probiótico en el alimento

Antes de adicionar las mezclas inmunoestimulantes en el alimento, se estandarizó la viabilidad de la bacteria láctica en el concentrado, para obtener como mínimo 1×10^8 UFC/ml por gramo de concentrado, para esto, la bacteria ácido láctica se sembró en caldo MRS, se incubó a 37°C en condiciones anaeróbicas, durante 48 horas, luego se centrifugó a 4000 rpm por treinta minutos, posterior a la

centrifugación la bacteria se lavó tres veces con SSFE, y se re-suspendió en 9 ml de SSFE. Se realizaron diluciones 1:10. De los tubos de las diluciones 10^{-7} a 10^{-9} , se sirvieron 0.1 ml por tubo a cada placa de MRS (teniendo en cuenta esta dilución como 10 veces menor al tubo seleccionado), se dejó incubar anaeróbicamente por 48 horas a 30°C , para finalmente realizar el recuento de UFC por gramo de alimento. Para disminuir el error del conteo se utilizó la fórmula para corrección de APHA (1984), en donde se tiene en cuenta las placas que tengan entre 30 y 300 UFC:

$$N = C \Sigma / [(1 * n_1) + (0,1 * n_2)] * (d)$$

Donde N = Número de colonias por gramos de producto

ΣC = Suma de todas las colonias en todas las placas contadas (de 30 a 300 UFC)

n_1 = Número de placas en la primera dilución contados

n_2 = Número de placas en la segunda dilución contados

d = dilución de la que los primeros recuentos se obtuvieron

La viabilidad de la bacteria se determinó igualmente posterior a la elaboración del pellet, para determinar si las bacterias toleraban el proceso de peletización, en donde se alcanzan temperaturas hasta de 45°C .

Inclusión de inmunoestimulantes en la dieta

Una vez obtenida una concentración mínima de 1×10^8 UFC/gr de la cepa láctica seleccionada, (evaluando previamente esta viabilidad durante el proceso de peletización); se adicionó al concentrado comercial (ITALCOL® 38% proteína) previamente molido y tamizado, junto con el LPS y el β -glucano, mezclando manualmente por quince minutos, adicionando el 22% de SSFE y realizando de nuevo el pellet (Tabla 1).

Tabla 1. Cantidad de los inmunostimulantes, probióticos y SSF adicionada al concentrado para la realización del pellet control y experimental. **Control:** Alimento comercial sin suplemento; **Dieta 1:** suplemento con LPS y β -glucanos; **Dieta 2:** suplemento con β -glucanos y *Lactobacillus casei*; **Dieta 3:** suplemento con LPS y *Lactobacillus casei*.

	Dietas			
	CONTROL	DIETA 1	DIETA 2	DIETA 3
Concentrado 38% ITALCOL® (g)	400	395	396	399
<i>Lactobacillus casei</i> (UFC/g)	0	0	$>10^7$	$>10^7$
LPS (g)	0	1	0	1
β -glucanos (g)	0	4	4	0
SSF (ml)	88	88	88	88

Al inicio del experimento y cada ocho días se continuó realizando recuento de bacterias viables por gramo de alimento, como se menciona anteriormente. El alimento se mantuvo refrigerado durante el periodo experimental (Aly *et al.*, 2008).

Animales experimentales

130 alevinos de tilapia híbrida (*Oreochromis sp.*), se obtuvieron de una granja comercial del Departamento del Meta, provenientes del mismo lote, con un peso promedio de $5,47 \pm 0,61$ g. Los peces se trasladaron a la sala de bioensayos de nutrición en el IALL, y se mantuvieron en 9 tanques de fibra de vidrio de 500 L, con aireación y temperatura constante (11 peces por tanque), los peces fueron aclimatados quince días previos a la fase experimental, en donde fueron alimentados con concentrado comercial (ITALCOL®) con nivel de proteína del 38%, alimentados al 4% diario de la biomasa total. Los parámetros de calidad de agua se mantuvieron dentro de los siguientes rangos: temperatura $26^\circ\text{C} \pm 1,2$, oxígeno disuelto: $7,87 \pm 0,9$, pH: $7,1 \pm 0,6$, dureza total: $9,13 \pm 2,1\text{mg L}^{-1}$; alcalinidad total: $4,7 \pm 0,5\text{L}^{-1}$, amonio total $0,8 \pm \text{mg L}^{-1}$.

Adicionalmente, se realizó la verificación del estado sanitario del lote, sacrificando y tomando muestras para análisis histopatológico a un pez por tanque para un total de nueve peces, siete días posteriores a la recepción. Esto para cada lote de alevinos experimentales utilizados. Seis peces por tratamiento cada semana durante cuatro semanas fueron sangrados y sacrificados para la toma de muestras abajo señaladas.

Muestra de sangre

6 peces se colectaron al azar por cada tratamiento y grupo control, cada ocho días los peces se anestesiaron por inmersión en una solución de 100 mg/L de Eugenol. Un volumen de sangre de 0.2 ml se colectó por punción de la vena caudal, a la altura de la inserción de la aleta anal, a 1.5 cm., por debajo de la línea lateral, mediante la utilización de una aguja 28G con heparina sódica como anticoagulante, para pruebas de parámetros hematológicos y actividad de la explosión respiratoria por medio de la reducción del azul de tetrazolio nitrado (NBT) (Anderson, *et al*, 1992). Posterior a la extracción de sangre, los peces se sacrificaron para la toma de muestras abajo descritas.

Evaluación de parámetros leucocíticos y hematocrito: Se tomaron 0.2 ml de sangre para determinar el hematocrito y leucocrito mediante el uso de capilares para microhematocrito por centrifugación a 12.000 rpm durante 5 minutos. El porcentaje del volumen de empacado celular se determinó por medio de lector del microhematocrito. De la misma muestra se realizaron extendidos, los cuáles fueron teñidos con Hemacolor® (Merck Chemicals, Germany), para realizar los recuentos diferenciales y determinar el porcentaje de linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, monocitos y basófilos.

Actividad de explosión respiratoria de neutrófilos: La muerte de un microorganismo después de su fagocitosis se debe principalmente a la producción

del radical anión superóxido. El azul de tetrazolio nitrado (NBT) es un compuesto claro, amarillo y soluble en agua que al reducirse forma el formazan, tinción de color azul oscuro. Los neutrófilos pueden reducir el colorante después de la ingestión de látex u otras partículas, subsecuente a la descarga metabólica abrupta generada por la vía derivada del monofosfato de hexosa (Fonseca, 2005). La reducción del NBT es una prueba útil para analizar la integridad metabólica de los neutrófilos por la generación del radical anión superóxido (Stites, 1999), y sirve también como un parámetro de inmunoestimulación.

Para determinar la actividad del NBT, 0.1 ml de sangre se colectó en celdas multipozos, a las cuáles se adicionará la misma cantidad de solución al 0.2% NBT y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. Una muestra con suspensión de sangre y NBT (0.05 ml) se adicionó a un tubo de ensayo con 2 ml de N, N, dimetil formamida y fue centrifugado por 5 minutos a 3000 rpm. Posteriormente se leyó por espectrofotometría a 620 nm (Siwicki *et al*, 1985) en celdas de cuarzo.

Evaluación anatomopatológica

Durante el tiempo de experimentación se realizó el examen clínico. Posterior a la toma de sangre se procedió a realizar la necropsia (a seis animales por cada tratamiento cada ocho días) siguiendo el protocolo descrito por Yannong (2003) para toma de muestras de hígado, bazo, intestino y estómago. Los órganos fueron fijados en formalina buferada al 10% para posterior imbibición en parafina y tinción con Hematoxilina y Eosina (H&E), para la realización de cortes de 3-5 μm ; para evaluación histológica con un microscopio Nikon ECLIPSE 80i.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado efecto fijo balanceado con la técnica de ANOVA y MANOVA donde las variables respuesta fueron: densidad óptica (NBT), hematocrito, leucocrito, porcentaje de neutrófilos,

linfocitos, monocitos, basófilos y eosinófilos. Se utilizaron las pruebas de contraste de Tukey y análisis canónico de índice ortogonal con un 95% de confiabilidad. Se validaron los supuestos del modelo y se empleo un análisis descriptivo exploratorio unidimensional para hallar media, desviación y coeficiente de variación. Los datos se transformaron mediante arco seno y se presentaron como el promedio \pm error estándar de la media (ESM). Los resultados fueron analizados mediante el software SAS/STAT ®versión 9.0 y SPSS versión 17 multilinguaje para Windows.



RESULTADOS

Extracción de LPS

De la siembra de *E. coli* en 1.200 ml de caldo BHI, se obtuvo un rendimiento total de 52 gramos de la bacteria con base en su peso húmedo. Veinticinco gramos obtenidos se tomaron para la extracción con butanol-agua (Morrison y Leive, 1975) y otros 25 gramos se tomaron para la extracción mediante la técnica de fenol-agua caliente (Westphal y Jann, 1965).

Con la técnica de fenol-agua caliente (Westphal y Jann, 1965), posterior y desecación en estufa, se obtuvo un extracto de LPS crudo de 400 mg. Mientras que el extracto obtenido por butanol-agua (Morrison y Leive, 1975) se obtuvo una biomasa de 1200 mg de LPS crudo. Esta última técnica se escogió para obtener el LPS crudo para adicionar a las dietas inmunoestimulantes, ya que el rendimiento fue óptimo para obtener la cantidad necesaria para incorporar en la dieta. El procedimiento de extracción con la técnica de butanol-agua se repitió, aumentando la biomasa recolectada, obteniendo 3000 mg de LPS crudo (Fig. 1).

Extracción de β -glucanos.

Para la extracción de β -glucanos, se utilizaron 40 gramos de *Saccharomyces cerevisiae* comercial, mediante el método de Northcote (1952) se obtuvieron doce gramos de β -glucanos, en peso seco, con un rendimiento del 30% (Fig. 2). Método adecuado para obtener la cantidad necesaria de incorporación a la dieta.

Control de esterilidad.

En las siembras realizadas en agar Saboreaud y agar BHI, no se observó crecimiento micótico ni bacteriano, para las muestras de LPS.

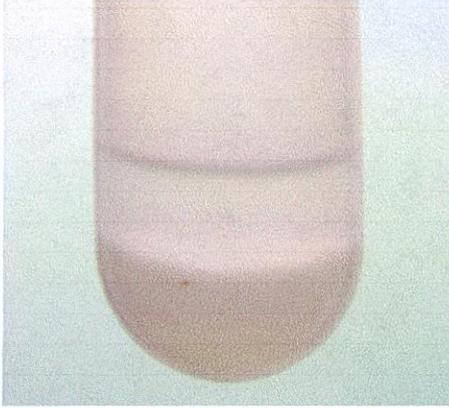


Figura 1. Fase acuosa donde se encuentra el LPS crudo, obtenido mediante el método butanol-agua (Morrison y Leive, 1975)



Figura 2. Precipitado en donde se encuentra β -glucano, la fase acuosa corresponde al componente manosa de la pared de *S. cerevisiae*.

Potencial probiótico *Lactobacillus sp.*

Las cepas utilizadas correspondieron en su totalidad a bacilos gram positivos, catalasa negativos, no obstante hubo una heterogeneidad en la evaluación comparativa de los tamaños así como del carácter liso o rugoso de las cepas. A excepción de las cepas 4 y 5, el crecimiento fue evidenciado a las horas de siembra. Solo las cepas 3, 5 y 7 evidenciaron un halo antagónico para *A. hydrophila* (Figura 3).

En la tabla 2 se resumen las características de las siete cepas ácido lácticas usadas para evaluar su potencial probiótico.



Figura 3. Halo de inhibición mostrado por tres cepas de bacterias ácido lácticas evaluadas sobre *A. hydrophilia*

Tabla 2. Características de tinción, crecimiento, catalasa y halo de inhibición de cepas ácido lácticas con potencial uso probiótico

Cepa	Gram	Colonias	Crecimiento (Horas)	Cat	Halo inhibición
1	Bacilos G + medianos gruesos en cadenas	Irregular rugosa	24	-	-
2	Bacilos G+ pequeños delgados en cadena	Lisa grande	24	-	-
3	Bacilos G+ medianos delgados cadena	Lisa pequeña	24	-	+
4	Bacilos G+ medianos gruesos en cadenas	Irregular rugosa	48	-	-
5	Bacilos G+ gruesos y largos	irregular rugosa	48	-	+
6	cocos G+ medianos, cadenas	colonias redondas lisas	24		
7	Bacilos G+ medianos gruesos en cadenas	Colonia irregular rugosa	24	-	+

Como se evidencia en las tablas 3 y 4, las cepas tuvieron porcentaje de sobrevivencia mayor o igual al 90% en los valores de pH evaluados. Así mismo, para las cepas 5 y 7, las cuales tuvieron una sobrevivencia del 100 % en los valores

de pH de 4 y 7,5; se evaluó la sobrevivencia a la incubación por 3 horas a 37 y 45 °C, siendo de 100 % y menor o igual a 85 %, respectivamente. De acuerdo a sus características de potencial probiótico: mejor tolerancia a pH y temperaturas y antagonismo con *A. hydrophila*, la bacteria correspondiente a la cepa numero 7 se escogió para realizar el perfil de fermentación del Kit API 50 CHL, el cuál arrojo que la cepa ácido láctica correspondía a *Lactobacillus casei*.

Tabla 3. Porcentaje promedio de sobrevivencia a pH 4 y pH 7,5 después de tres horas de incubación, de cepas ácido lácticas antagonicas de *Aeromonas hydrophila*.

pH	Cepa 1	Cepa 3	Cepa 5	Cepa 7
4	90%	95%	100%	100%
7,5	100%	100%	100%	100%

Tabla 4. Porcentaje promedio de sobrevivencia a 37°C y 45°C, después de tres horas de incubación, de cepas ácido lácticas antagonicas de *Aeromonas hydrophila* y tolerantes a pH 4 y 7,5.

Temperatura	Cepa 5	Cepa 7
37°C	100%	100%
45°C	75%	85%

De acuerdo a sus características de potencial probiótico: Mejor tolerancia a pH y temperaturas y antagonismo con *A. hydrophila*, la bacteria correspondiente a la cepa numero 7 se escogió para realizar el perfil de fermentación del Kit API 50 CHL, el cuál arrojo que la cepa ácido láctica correspondía a *Lactobacillus casei*.

Preparación del alimento con probióticos

La preparación del probiótico se llevó a cabo inoculando *L. casei*, en caldo MRS incubado a 30°C por 48 horas. Posterior a la centrifugación y los lavados con solución salina fisiológica estéril (SSFE), se obtuvo una suspensión con 5,1

$\times 10^{12}$ UFC/ml. La suspensión bacteriana se adicionó a cada una de las dietas experimentales que contenían la bacteria láctica. El recuento de bacterias viables fue hecho inmediatamente a la re-elaboración del pellet y de la misma manera cada ocho días hasta el día 27. Los resultados del recuento arrojaron bacterias viables desde $4,2 \times 10^7$ UFC/gr, para el día 27 en la dieta 2 (Tabla 5).

Tabla 5. Viabilidad de la bacteria posterior a la adición del concentrado mantenido a 4°C (Aplicando el factor de corrección de APHA, 1984). **Dieta 2:** suplemento con β -glucanos y *Lactobacillus casei*; **Dieta 3:** suplemento con LPS y *Lactobacillus casei*

Concentración	DIETA 2 (UFC/g)	DIETA 3(UFC/g)
inicial (post re-elaboración del pellet)	$1,2 \times 10^{10}$	$3,9 \times 10^{10}$
14 días	$9,3 \times 10^8$	$2,4 \times 10^9$
27 días	$4,2 \times 10^7$	$8,5 \times 10^7$

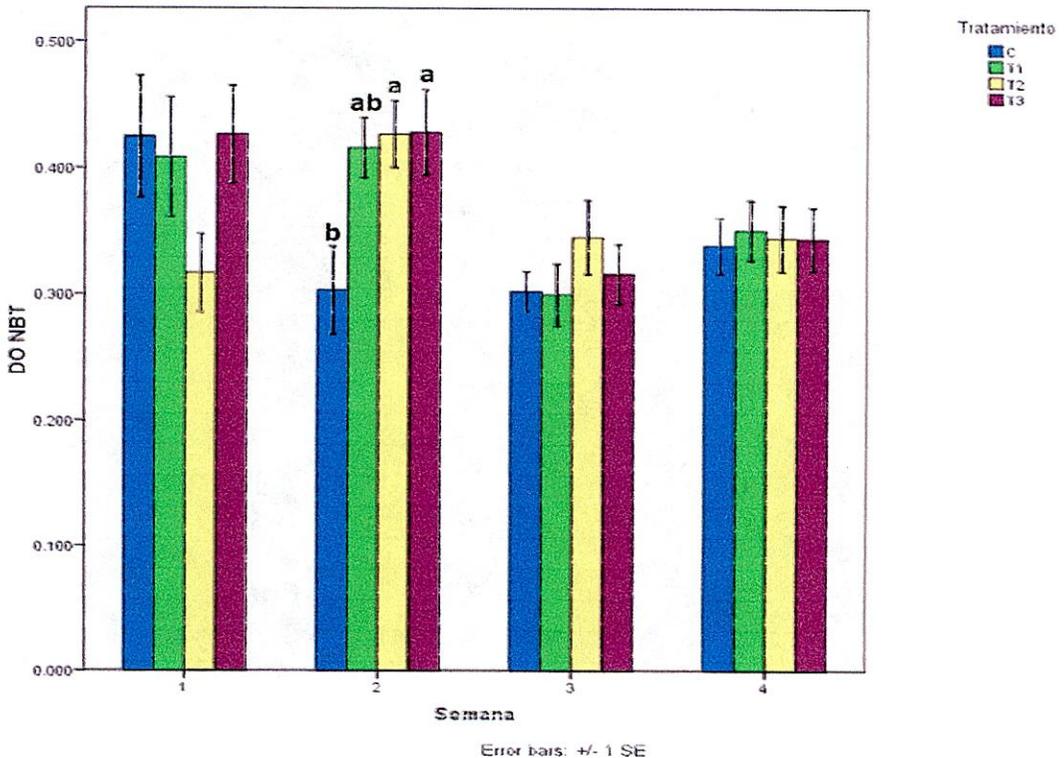
Recuento diferencial, hematocrito, explosión respiratoria del peces alimentados con dietas inmunoestimulantes.

La tabla 6 resume los valores de NBT, porcentaje del hematocrito (%HTO), linfocitos (%LINF), monocitos (%MON), neutrófilos(%NEUTRO), eosinófilos (%EOSINO) y basófilos (%BASOF), obtenidos durante el suministro de las dietas inmunoestimulantes durante las cuatro semanas experimentales.

Tabla 6. Valores de los parámetros inmunes obtenidos durante el suministro de las dietas. **C:** peces alimento sin suplemento, **T1:** peces con suplemento de LPS y β -glucanos; **T2:** peces con suplemento de β -glucanos y *Lactobacillus casei*; **T3:** peces con suplemento de LPS y *Lactobacillus casei*. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

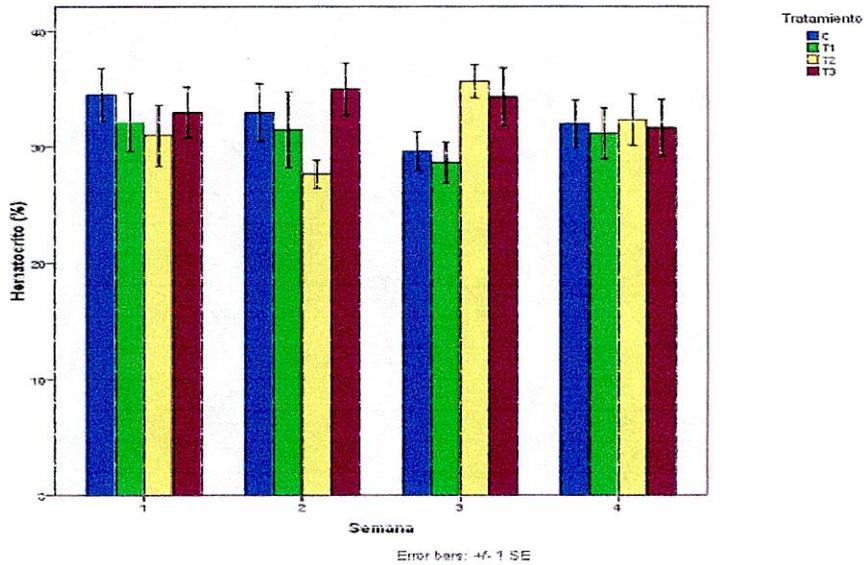
SEMANA	TTO	NBT	%	%	%	%	%	%
		DO620	Hematocrito	Linfocitos	Monocitos	Neutrófilos	Eosinófilos	Basófilos
		nm.						
DÍA 0		0,33	35,19	73,25	20,25	6,44	0,00	0,00
		$\pm 0,07$	$\pm 6,57$	$\pm 5,99$	$\pm 4,82$	$\pm 3,67$		
1	C	0,3035	34,5	69,67	25,17	5,17	0,00	0,00
		$\pm 0,09$	$\pm 5,61$	$\pm 7,87$	$\pm 6,18$	$\pm 4,40$		
	T1	0,416	32,17	71	24,33	4,67	0,00	0,00
		$\pm 0,06$	$\pm 6,11$	$\pm 9,19$	$\pm 6,86$	$\pm 3,33$		
	T2	0,32	31	64,33	31,83	3,83	0,00	0,00
		$\pm 0,08$	$\pm 6,42$	$\pm 9,71$	$\pm 7,57$	$\pm 5,08$		
	T3	0,43	33	66,33	29,33	4,17	0,17	0,00
		$\pm 0,08$	$\pm 5,29$	$\pm 9,44$	$\pm 8,33$	$\pm 2,48$	$\pm 0,41$	
2	C	0,42	33	75	18,33	6,67	0,00	0,00
		$\pm 0,12$	± 6	$\pm 7,56$	$\pm 6,8$	$\pm 3,2$ a		
	T1	0,41	31,5	77,5	17,17	5,33	0,00	0,00
		$\pm 0,12$ ab	$\pm 7,97$	$\pm 8,67$	$\pm 8,4$	$\pm 3,88$ ab		
	T2	0,43	27,67	80,5	15,5	4	0,00	0,00
		$\pm 0,06$ a	$\pm 2,94$	$\pm 4,85$	$\pm 5,75$	$\pm 2,28$ ab		
	T3	0,43	35	79,67	19	1,33	0,00	0,00
		$\pm 0,09$ a	$\pm 5,48$	$\pm 3,98$	$\pm 3,95$	$\pm 1,21$ b		
3	C	0,30	29,67	80,33	14,17	5,5	0,00	0,00
		$\pm 0,04$	$\pm 4,08$	$\pm 6,12$ ab	$\pm 8,82$	$\pm 3,89$ a		
	T1	0,3	28,67	75,67	17,67	6,5	0,00	0,00
		$\pm 0,06$	$\pm 4,32$	$\pm 5,72$ b	$\pm 3,08$	$\pm 3,78$ ab		
	T2	0,35	35,67	86	11,33	2,5	0,00	0,00
		$\pm 0,07$	$\pm 3,5$	$\pm 5,22$ a	$\pm 4,5$	$\pm 1,38$ ab		
	T3	0,32	34,33	84	14,5	1,8	0,00	0,00
		$\pm 0,06$	$\pm 6,09$	$\pm 6,13$ ab	$\pm 4,85$	$\pm 1,3$ b		
4	C	0,34	32 \pm	76,83	18,67	4,5	0,00	0,00
		$\pm 0,05$	4,98	$\pm 9,02$	$\pm 8,45$	$\pm 2,26$		
	T1	0,35	31,17	75,67	20,33	4	0,00	0,00
		$\pm 0,06$	$\pm 5,31$	$\pm 8,82$	$\pm 7,79$	$\pm 2,53$		

T2	0,34	32,33	74	21,17	4,83	0,00	0,00
	± 0,06	± 5,39	± 7,69	± 6,18	± 3,43		
T3	0,34	31,67	75,67	20,6	3,67	0,00	0,00
	± 0,06	± 5,96	± 6,53	± 6,06	± 1,51		

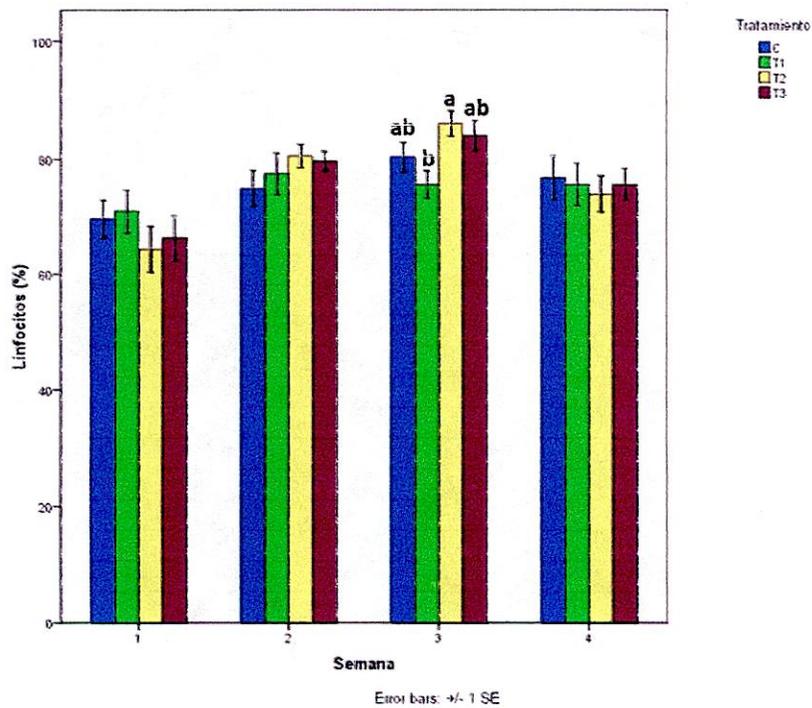


Gráfica 1. . Valores de explosión respiratoria (Densidad óptica DO 620 nm), en peces alimentados con diferentes inmunostimulantes. C= Control, T1= Tratamiento 1; T2= Tratamiento 2; T3= Tratamiento 3. Valores expresados como promedio ± E.S.M. Barras con letras diferentes expresan diferencias significativas ($p < 0.05$)

Los valores de reducción del NBT (DO 620 nm), mostraron que los tratamientos de peces alimentados con suplemento de β -glucanos y *Lactobacillus casei* y el tratamiento con suplemento de LPS y *Lactobacillus casei*, fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) que el resto de tratamientos, durante la segunda semana de alimentación. Durante el resto de semanas no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y el grupo control (Gráfica 1).

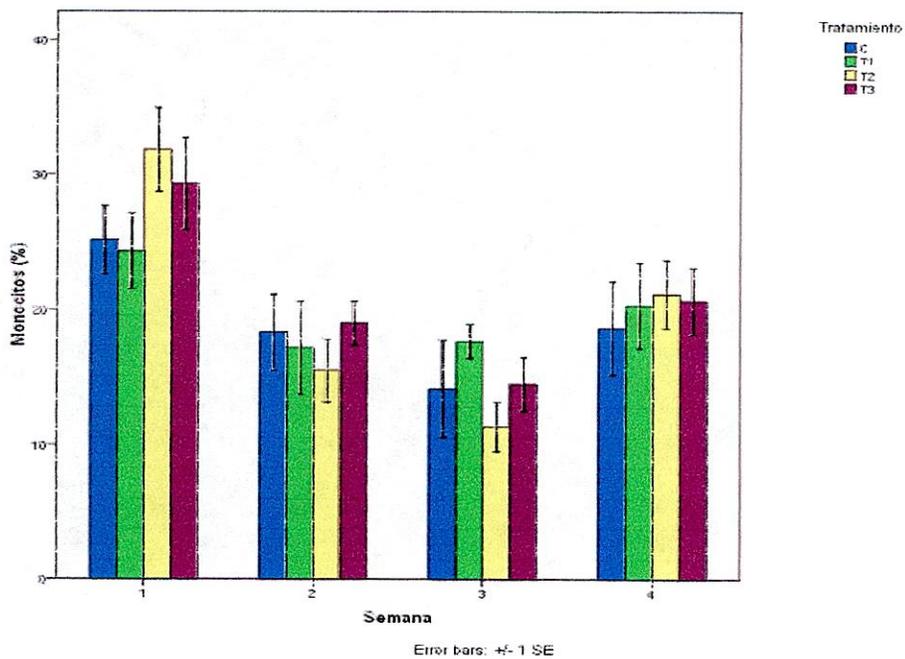


Gráfica 2. Valores de Hematocrito en peces alimentados con diferentes inmunoestimulantes C= Control, T1= Tratamiento 1; T2= Tratamiento 2; T3= Tratamiento 3. Valores expresados como promedio \pm E.S.M. Barras con letras diferentes expresan diferencias significativas ($p < 0.05$)



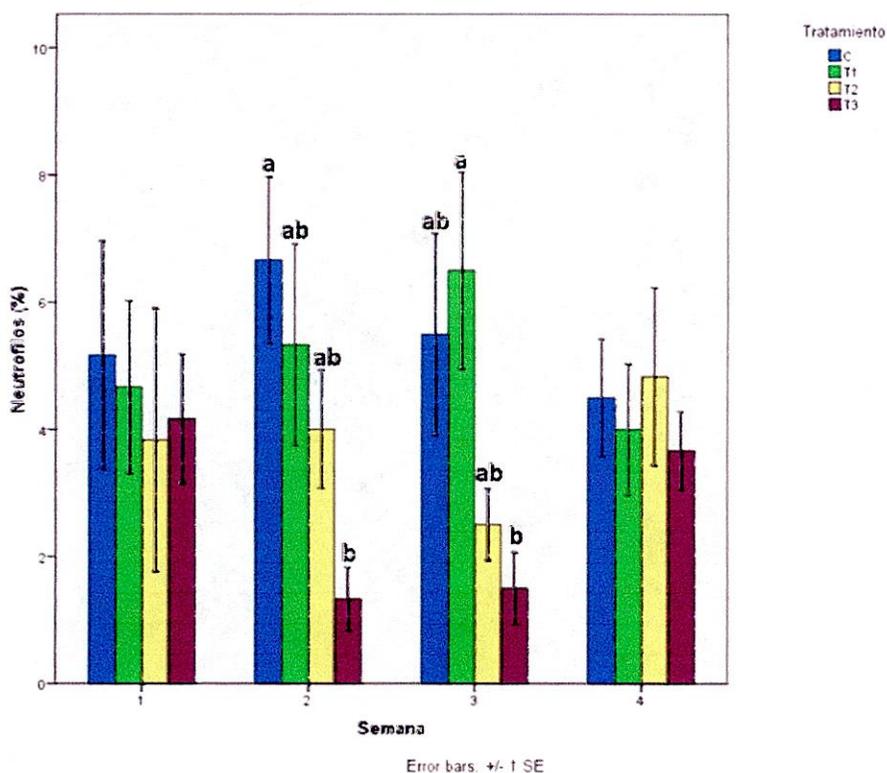
Gráfica 3. Valores de Linfocitos en peces alimentados con diferentes inmunoestimulantes C= Control, T1= Tratamiento 1; T2= Tratamiento 2; T3= Tratamiento 3. Valores expresados como promedio \pm E.S.M. Barras con letras diferentes expresan diferencias significativas ($p < 0.05$)

Los valores de recuento de linfocitos mostraron que la dieta con suplemento de β -glucanos y *Lactobacillus casei*, mostró un incremento significativo durante la tercera semana de suministro. Durante la primera, segunda y cuarta semana no se observaron diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$) (Gráfica 3).



Gráfica 4. Valores de monocitos en peces alimentados con diferentes inmunoestimulantes. C= Control, T1= Tratamiento 1; T2= Tratamiento 2; T3= Tratamiento 3. Valores expresados como promedio \pm E.S.M. Barras con letras diferentes expresan diferencias significativas ($p < 0.05$)

Los porcentajes de hematocrito y monocitos de los tratamientos con suplemento inmunoestimulantes y grupo control no mostraron diferencias significativas, entre los grupos tratamiento y control, ni durante ninguna de las semanas de alimentación (Gráfica 2 y Gráfica 4).



Gráfica 5. Valores de neutrófilos en peces alimentados con diferentes inmunostimulantes. C= Control, T1= Tratamiento 1, T2= Tratamiento 2, T3= Tratamiento 3. Valores expresados como promedio \pm E.S.M. Barras con letras diferentes expresan diferencias significativas ($p < 0.05$)

Los porcentajes de neutrófilos del tratamiento con dietas LPS y *Lactobacillus casei* disminuyeron significativamente durante la segunda y tercera semana de suministro, con respecto al grupo control. Durante la primera y cuarta semana no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y el grupo control ($p < 0.05$) (Gráfica 5).

Los órganos de los peces alimentados con las dietas con mezclas inmunostimulantes, en el examen microscópico, mantuvieron la estructura normal y no mostraron alteraciones patológicas (Fig. 4 a Fig. 8). Durante el análisis microscópico del bazo, se observó que en las dietas dos y tres, es decir las mezclas de *L. Casei* con LPS y *L. Casei* con β -glucanos, se presentó mayor activación de centros melanomacrófagos (CMM) (Fig. 11 y 12), que aquellos en la dieta 1 (LPS y

β -glucanos) y la dieta control durante la primera y la segunda semana de alimentación. A pesar de la activación, el bazo se mostró de apariencia normal en las dos dietas.

En el hígado de manera general, se observaron cambios degenerativos parenquimatosos, de leves a moderados asociados a lipidosis, cambios observados a partir de la primera semana, hasta la cuarta semana incluso en la dieta control (Fig.12, 13 y 14).

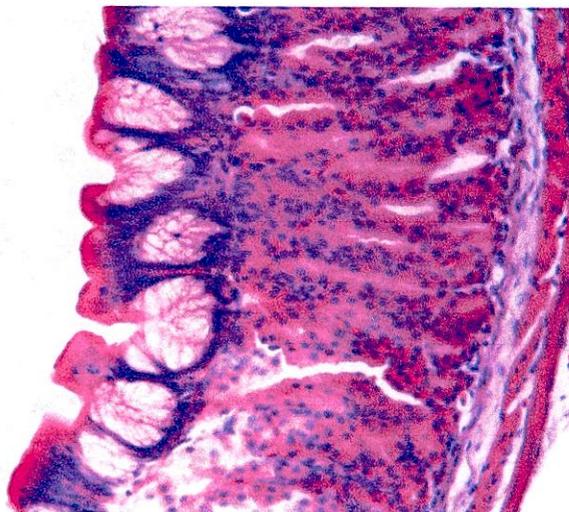


Figura 4. Estómago. Apariencia normal dieta LPS con β -glucanos, durante la primera semana 400x.

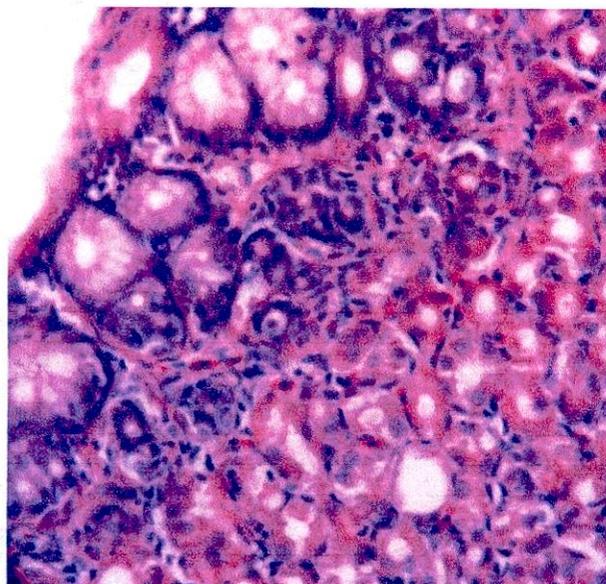


Figura 5. Estómago. Apariencia normal. Dieta control segunda semana 400x.

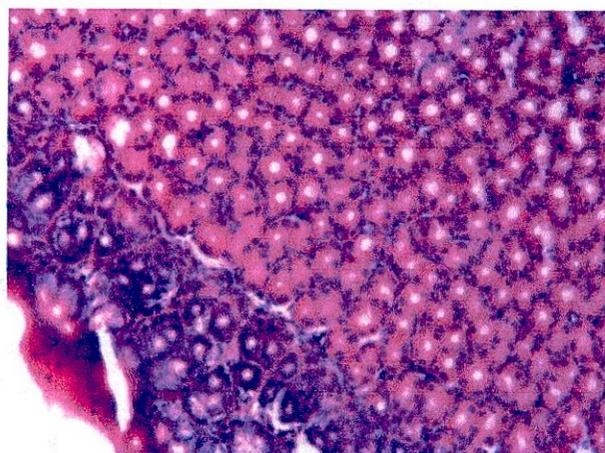


Figura 6. Estómago. Apariencia normal, segunda semana *L*, caseicon β -glucanos. 400x.

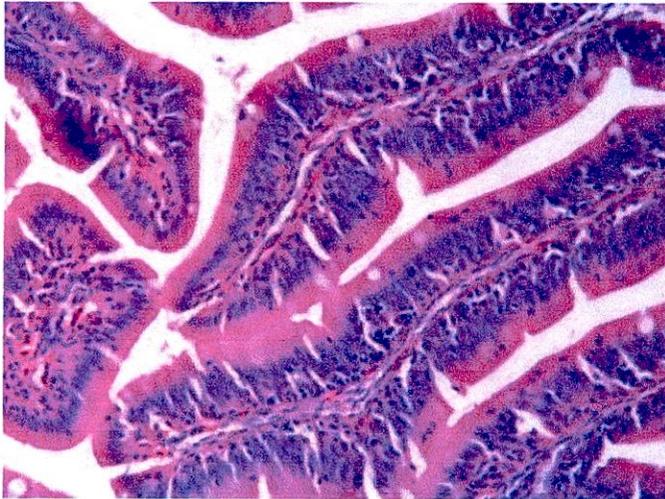


Figura 7. Intestino. Apariencia normal. Dieta β -glucanos con *L. casei* tercera semana 400x.

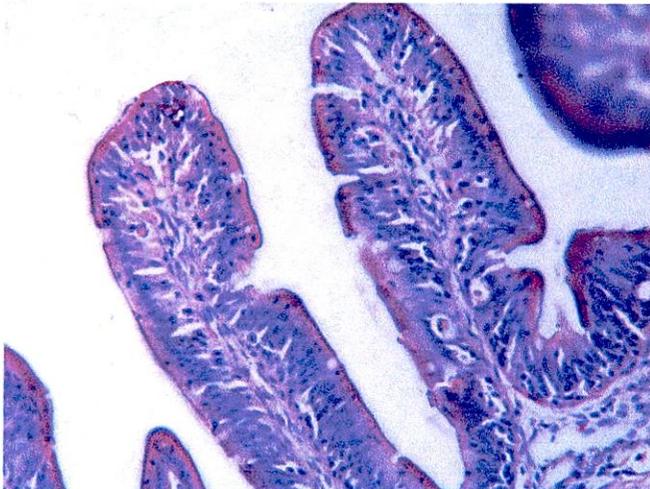


Figura 8. Intestino. Dieta LPS con *L. casei* cuarta semana 400x.

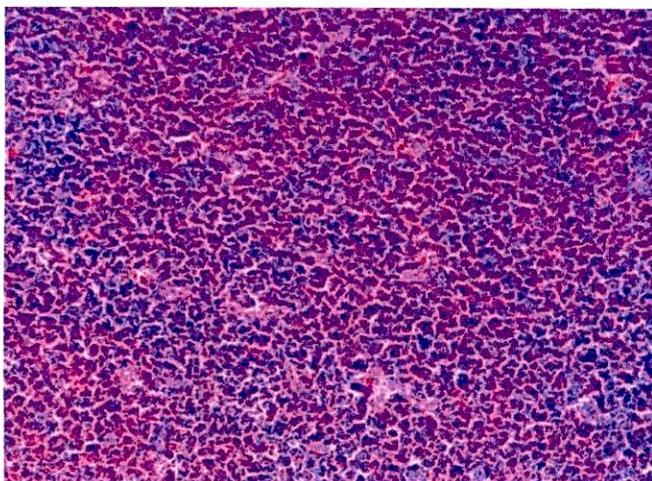


Figura 9. Bazo dieta control, durante la primera semana de alimentación. 100x.

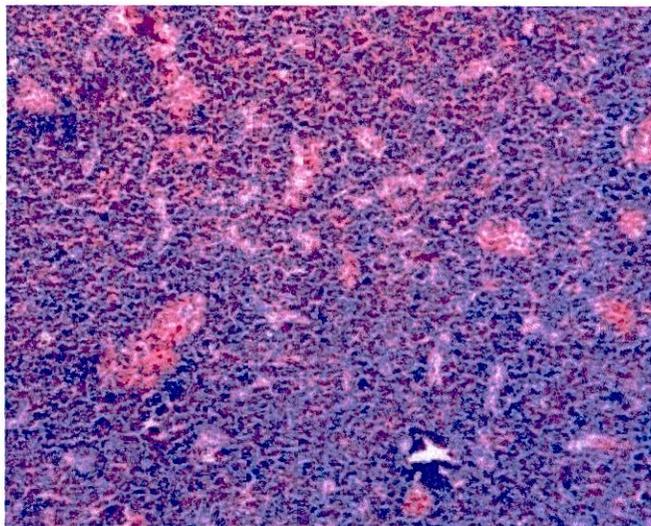


Figura 10. Bazo dieta con *L. casei* y β -glucanos, durante la segunda semana de alimentación. Nótese mayor abundancia de CMM 100x.

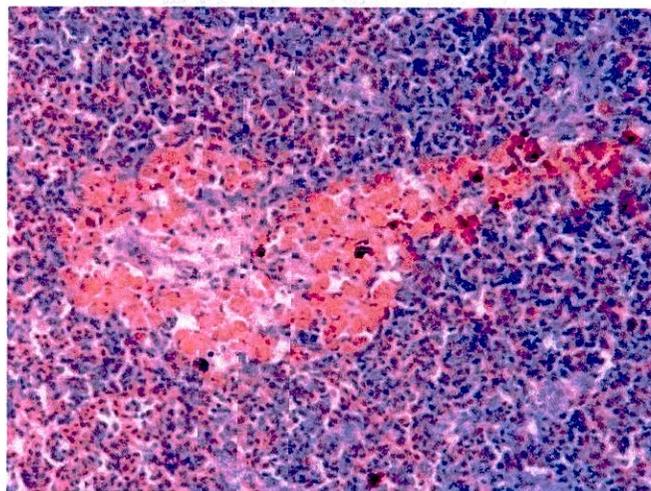


Figura 11. Bazo dieta con *L. casei* y β -glucanos, durante la segunda semana de alimentación. Aumento de CMM 4000x.

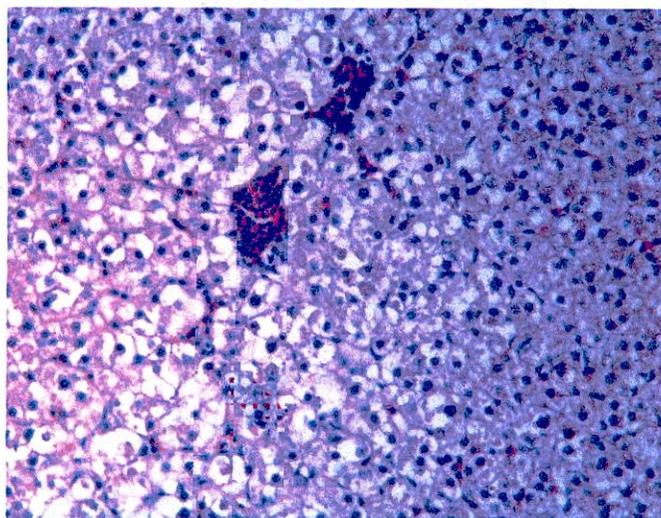


Figura 12. Hígado dieta LPS con β -glucanos durante la primera semana de alimentación 400x. Se observa cambios degenerativos leves.

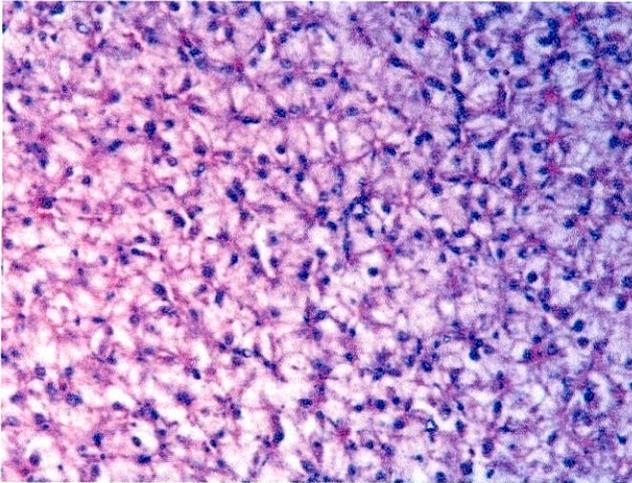


Figura 13. Hígado dieta control durante la tercera semana de alimentación 400x.

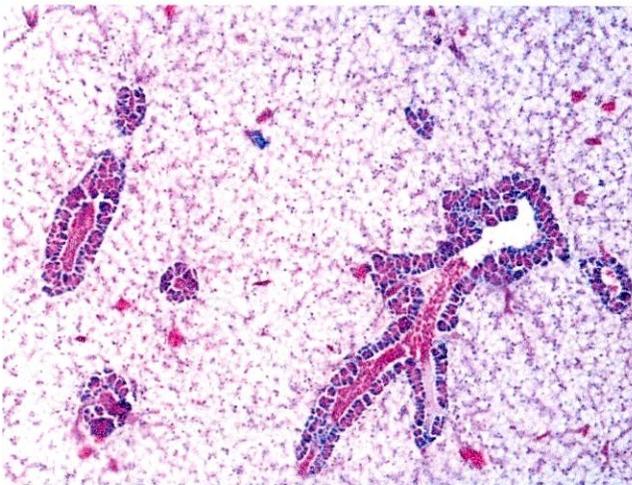


Figura 14. Hígado dieta control durante la cuarta semana de alimentación 100x.

DISCUSIÓN

Los resultados de extracción de LPS crudo y β -glucanos, mediante la técnica de Morrison y Leive (1975) y Westphal y Jan (1965), respectivamente, mostraron que son técnicas viables para la obtención de cantidades necesarias de estas sustancias microbianas, para la utilización como inmunoestimulantes, pudiendo ser tecnologías viables para su utilización a gran escala, ya que se pueden llevar a cabo de manera más sencilla en comparación con otras técnicas de extracción que incrementarían el costo.

De las cepas ácido lácticas evaluadas, la que mostró mejor potencial probiótico *in vitro*, fue *Lactobacillus casei*. Se ha determinado que dentro de las bacterias lácticas, bacterias del género *Lactobacillus* son generalmente reconocidas como seguros (GRAS por sus siglas en inglés *Generally Recognized as Safe*), mientras otros miembros de bacterias ácido lácticas, como los miembros del género *Streptococcus* y *Enterococcus* contienen muchos patógenos oportunistas (Salmien y Ouwehand, 2002). En el presente estudio *L. casei* demostró tolerancia a pH 4 y 7,5 (sobrevivencia del 100%); se ha demostrado en estudios previos que *L. casei* puede sobrevivir el tránsito gastrointestinal y colonizar el intestino en humanos (Crittenden *et al.*, 2002; Verdenelli *et al.*, 2008). En estudios previos, *L. casei*, aislada de heces humanas, mostró sobrevivencia a condiciones bajas de pH 3, por cinco horas (Verdenelli *et al.*, 2008); diferentes cepas de *L. Casei* de laboratorio y aisladas de productos lácteos, mostraron viabilidad sobre 10^7 UFC/ml luego de tres horas de incubación en un pH de 3 (Mishra y Prasad, 2005). Adicionalmente, esta bacteria láctica posee tolerancia a ácido biliares incluso a concentraciones altas (0.5%). Aunado a estas características, *L. casei*, mostró una fuerte inhibición *in vitro* contra patógenos de humanos como *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens* (Verdenelli *et al.*, 2008). Mishra y Prasad (2005) mostraron antagonismo de cinco diferentes cepas de *L. casei* contra: *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Shigella dysenteriae*. Por otro lado Kivanc (1990) mostró propiedades antibacteriales de *L. casei* aislada de queso cheddar ante bacterias gram positivas y gram negativas. En este estudio se reporta adicionalmente, efecto inhibitorio contra el patógeno de importancia en peces *Aeromonas hydrophila*.

Adicionalmente, *L. casei*, mostró resistencia temperaturas de 37°C y 45°C, lo que proporcionó sobrevivencias óptimas durante el proceso de la re-elaboración del pellet (en donde se alcanza temperaturas de 45°C), permitiendo que posterior a la peletización viabilidades de la bacteria de 1.2×10^{10} y 3.9×10^{10} UFC/gr para las dietas 2 y 3 respectivamente, concentraciones suficientes para mantener la viabilidad durante 27 días a 4°C, con la concentración de 4.2×10^7 para las dietas dosy 8.5×10^7

UFC/gr para la dieta tres, manteniéndose el mínimo reportado para ejercer los efectos benéficos de un probiótico en raciones de alimentos. Adicionalmente, el proceso de pelletización garantizó una homogeneidad y permanencia de la bacteria dentro del pellet.

Debido a las características mencionadas *L. casei*, es una cepa láctica con características de potencial probiótico, con características de tolerancia a ambientes intestinales en humanos y animales, capaz de tolerar temperaturas de procesos para su incorporación en alimentos. Así *L. casei*, se empleó como probiótico para incorporarse con otras sustancias inmunoestimulantes para evaluar los efectos *in vivo* en tilapia híbrida.

La manera en la cual los inmunoestimulantes y las bacterias probióticas suministradas a través de las dietas, ejercen su efecto benéfico no está completamente dilucidada. Sin embargo, una de las implicaciones más importantes está dada por el efecto de inmunomodulación mediado por el sistema de mucosas intestinal, el cual se refleja a nivel sistémico (Kekoken, 2008). Por esta razón durante el suministro de las mezclas probióticas (LPS+ β -glucanos, LPS+*Lactobacillus casei* y *Lactobacillus casei*+LPS), se evaluó la respuesta celular a través del porcentaje del hematocrito, recuento diferencial y reducción del NBT.

Los valores de reducción de NBT, de peces alimentados con suplemento de β -glucanos y *Lactobacillus casei* y el tratamiento con suplemento de LPS y *Lactobacillus casei*, fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) que el tratamiento control, durante la segunda semana de alimentación (Gráfica 1). Los valores de densidad óptica del NBT, nos indica la reducción de este compuesto a formazan por la producción del radical superóxido, que así mismo se incrementan de manera importante por la reducción del oxígeno por los electrones que pasan del NADPH generados dramáticamente, a una citocromo única de membrana, proceso que se incrementa significativamente al inicio de la fagocitosis. Por tanto el suplemento de las bacterias ácido lácticas viables en el alimento puede afectar directamente la

actividad bactericida de los leucocitos. Estos hallazgos concuerdan con lo reportado por Salinas *et al.* (2005), que reportaron un incremento en la actividad bactericida de *Sparus aurata* con suministró en la dieta de *Lactobacillus delbrueckii* y *Bacillus subtilis* después de dos semanas de alimentar con cada una de las cepas individuales, tiempo de activación similar a lo hallado en el presente estudio, el autor encontró además que la actividad se mantuvo alta por más tiempo durante el suministro con combinación de ambas cepas probióticas, después del periodo de dos semanas sin embargo el efecto disminuye. Otros estudios también han reportado mayor durabilidad en los efectos con la combinación de bacterias probióticas (Ali *et al.*, 2010; Salinas *et al.*, 2005). Anteriormente, también se ha determinado el incremento significativo en la actividad bactericida de leucocitos de peces alimentados con bacterias probióticas (Balcázare *et al.*, 2006; Kim y Austin, 2006; Nopadon *et al.*, 2006; Salinas *et al.*, 2005; Panhigrahi *et al.*, 2005; Marzouk *et al.*, 2008).

A pesar que la actividad bactericida, también ha sido ampliamente reportada en peces alimentados con β -glucanos provenientes de *Saccharomyces cerevisiae* (Rodríguez *et al.*, 2009; Misra *et al.*, 2006; Selvaraj *et al.*, 2005), no se observó en el presente estudio un efecto sinérgico de la mezclas con *L. casei*, al no observar diferencias significativas entre las mezclas con y sin β -glucanos. Sin embargo los valores de recuento de linfocitos mostraron que la dieta con suplemento de β -glucanos y *Lactobacillus casei*, mostró un incremento a partir de la segunda semana, siendo significativo en la tercera semana de suministro ($p < 0.05$) (Gráfica 3). También en estudios de Marzouk *et al.*, (2008), acerca de la incorporación de probióticos (*Bacillus subtilis* y *Saccharomyces cerivisiae*) en la dieta de tilapia nilótica (*Oreochromis sp*), se evidenció un elevado número de linfocitos, sugiriendo que los cambios en los niveles sanguíneos de algunas células puede ser atribuido a la estimulación de la hematopoyesis por parte de los probióticos. Así la la mezcla del β -glucano y el lactobacilo favorece el incremento de estas células. A pesar que la producción de anión superóxido del tratamiento con suplemento de LPS y *Lactobacillus casei*, fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que el tratamiento control

durante la segunda semana igual que la mezcla del glucano y el lactobacilo, los porcentajes de neutrófilos de este tratamiento disminuyeron significativamente durante la segunda y tercera semana de suministro, con respecto al grupo control ($p < 0.05$) (Gráfica 5); sugiriendo así que la mezcla en la dieta a partir de la segunda semana, no es la más adecuada para el incremento de las células de defensa del organismo.

Tanto la carencia de signos clínicos, como la carencia de diferencias de tipo patológico entre los tratamientos con inmunoestimulantes y grupo control, evaluados mediante el examen macroscópico y microscópico, indican que ninguna de las dietas ejerce un efecto adverso sobre la salud los peces durante las cuatro semanas de administración.

Durante el análisis microscópico del bazo, se observó que en las dietas con las mezclas de *L. Caseicon* LPS y *L. Caseicon* β -glucanos, se presentaba mayor cantidad de centros melanomacrófagos (CMM) (Fig. 11 y 12), que aquellos en la dieta de LPS y β -glucanos y la dieta control durante la primera y la segunda semana de alimentación. Manteniéndose la arquitectura normal de este órgano. En estudios de Marzouk *et al.*, (2008), se demostró que alevinos de tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) alimentados con probióticos (*Saccharomyces cerevisiae* y *Bacillus subtilis*), mostraron activación de centros melanomacrófagos en el hígado y bazo lo cual es concordante con lo hallado en esta investigación. De la misma manera, trabajos de Rajesh *et al.*, (2006) demuestran que la exposición a dietas suplementadas con probióticos incrementan la activación de centros melanomacrófagos en carpas de la india.

En el hígado, los cambios degenerativos leves en hepatocitos se presentaron en todos los grupos experimentales y grupo control (Fig. 12, 13 y 14), por el cuál este efecto no se atribuye a los suplementos inmunoestimulantes.

De acuerdo a los parámetros sanguíneos evaluados y análisis microscópico, el tratamiento con suplemento de *Lactobacillus casei* y β -glucanos, suministrados por

dos semanas, demostró mayor porcentaje de linfocitos, reducción de NBT, mantenimiento de monocitos y neutrófilos, junto con una activación de CMM en el bazo; por tal razón se escogió para la realización de la evaluación del efecto protector contra *Aeromonas hydrophila* que se describe en el tercer y último capítulo.

CONCLUSIONES

Las técnicas de extracción utilizadas de LPS crudo y β -glucanos, demuestran ser técnicas viables para la obtención de cantidades necesarias para la incorporación en el pienso de peces de cultivo.

La bacteria ácido láctica *Lactobacillus casei* mostró las características adecuadas de potencial probiótico en peces, debido a sus características *in vitro*, como los son antagonismo ante *A. hydrophila*, tolerancia a pH gastrointestinal en peces y resistencia a elevadas temperaturas (45°C).

El suministro de dietas con mezclas inmunoestimulantes de *L. casei*, β -glucanos y LPS, a alevinos de tilapia híbrida, no mostró efectos deletéreos sobre la salud de los peces, suministrado durante cuatro semanas.

Tilapias híbridas (*Oreochromis. spp*) alimentadas con suplementos de *L. casei* y β -glucanos, suministrados por dos semanas, muestran una mayor estimulación del sistema inmune, a través del incremento en la producción del anión superóxido e incremento en linfocitos, así como una mayor activación de CMM en el bazo.

BIBLIOGRAFÍA

Ali HM, Ghazalahl A, Gehad EA, Hammouda YA, Abo-State HA. Practical aspects and immune response of probiotics preparations supplementes to Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) diets. *Nature and Science* 2010, 8(5): 39-45.

Aly S, Ahmed Y, Ghareed A, Mohamed M. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish Shellfish Immunol* 2008, 25: 128-136.

Anderson DP, Moritomo T, Grooth R. Neutrophil glass-adherence, nitroblue titerazolum assay give early indication of immunization effectiveness in rainbow trout. *Vet Immunol Immunopathol* 1992, 30:419-429.

APHA. Asociación Americana de Salud Pública. Compendio de métodos para el examen microbiológico de los alimentos, 2^a ed. APHA, Washington, DC. 1984.

Balcazar J, Vendrell D, de Blas I, Ruiz I, Girones O, Muzquia J. Immune modulation by probiotic strains: quantification of phagocytosis of *Aeromonas hydrophila* by leukocytes isolated from gut of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using a radiolabelling assay. *Comp Immun, Microb & Infect Dis* 2006, 29: 335-343.

Cai Y, Suyanandana P, Saman P, Benno Y. Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from intestines of common carp and freshwater prawns. *J Gen Appl Microbiol* 1999,45: 177-184.

Crittenden R, Saarela M, Mättö J, Ouwehand A, Salminen S, Peltö I, Vaughan E, De Vos W, Von Wright A, Fondén R, Mattila-Sandholm T. *Lactobacillus casei* subsp. *casei* F19: Survival, ecology and safety in the human intestinal tract—a survey of feeding. Studies within the probdemo project. *Microbial Ecology In Health And Disease*. 2002. 14 (1):22-2.

FAO. State of world aquaculture. Production: environments, species, quantities and values. Fishery and Aquaculture Department. Corporate Document Repository. Fisher Technical paper N°500 2006. Roma. 16 p.

Fonseca A. Guia para el diagnostico de las inmunodeficiencias primarias por el laboratorio de inmunología clínica. Monografía. Facultad de ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. 2005.

Kekkonen R. Immunomodulatory effects of probiotic bacteria in healthy adults. Academic Dissertation. Institute of Biomedicine, Pharmacology. University of Helsinki. Finland, 2008. 119p.

Kim D, Austin B. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish Shellfish Immunol* 2006, 21:513-524.

Kivanc, M. Antagonistic action of lactic culture towards spoilage and pathogenic microorganisms in food. *Nahrung*1990, 34, 273.

Klayraung S, Viernstein H, Sirithunyalug J, Okonogi S. Probiotic properties of Lactobacilli isolated from Thai traditional food. *Sci Pharm*2008, 76: 485–503.

Marzouk MS, Moustafa M, Mohamed NM. The influence of some probiotics on the growth performance and intestinal microbial flora of *O. niloticus*. In: 8thInternational symposium on tilapia in aquaculture 2008; 1059-1071

Mishra V, Prasad D N. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probióticos. Short communication. *Int J Food Microbiol* 2005; 103:109–115.

Morrison D, Leive L. Fractions of lipopolysaccharide from *Escherichiacoli* 0111:B4 prepared by two extraction procedures. *The Journal of Biological Chemistry* 1975, 250(8):2911-2919.

Nopadon P, Kobayashi T, Katagiri T, Maita M, Endo M. Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Vet Immunol Immunopathol* 2006, 113:339–347.

Northcote H, Horne R. The chemical composition and structure of the yeast cell wall. *Biochem J* 1952; 51(2):322-236.

Panigrahi A, Kirana V, Puangkaewa J, Kobayashib J, Satoha S, Sugita H. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 2005, 243:241–254.

Rajesh K, Subhas CM, Kurcheti PP, Asim KP. Evaluation of *Bacillus subtilis* as a probiotic to Indian major carp, *Labeo rohita*. *Aquaculture Research* 2006, 37, 1215-1221.

Rey A. Caracterización de las enfermedades de tilapia híbrida (*Oreochromis sp.*) cultivada en el departamento del Tolima. Sistematización de la información. Maestría en salud y producción animal. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Bogotá, 2002.

Rodriguez I, Chamorro R, Novoa B, Figueras A. 2009. β -glucan administration enhances disease resistance and some innate immune responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Shellfish Imm* 27:369-373.

Salinas I, Cuesta A, Esteban A, Meseguer J. Dietary administration of *Lactobacillus delbrueckii* and *Bacillus subtilis*, single or combined, on gilthead seabream cellular innate immune response. *Fish & Shellfish Immunol*. 2005, 19: 67-77.

Salmien S, Ouwehand A. Probiotics, applications in dairy products. In: Roginski H, Fuquay J and Fox P. *Encyclopedia of dairy Science*. Elsevier. Londres, 2002. pp 2315-2322.

Sarma M, Sapto D, Sarma S, Gohain AK. Herbal growth promoters on hemato-biochemical constituents in broilers. *Indian Vet J* 2003, 80: 946-948.

Selvaraj V, Sampath K, Sekar V. Adjuvant and Immunulatory effect of β -glucan administration in combination with LPS enhances survival and some immune parameters in carp challenge with *A. hydrophila*. *Vet Immunol Immunopathol* 2006, 114:15-24.

Selvaraj V, Sampath K, Sekar V. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*).infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunol* 2005b, 19:293-306.

Selvaraj V, Sampath K, Sekar V. Use of glucan from *Saccharomyces cerevisiae* as an immunostimulant in carp: impact on hematology, phagocyte function, and infection with *Aeromonas hydrophila*. *Israeli J Aquaculture* 2005a, 57(1):39-48

Stites D, Terr D, Parslow T. Inmunología básica y clínica. Novena edición. Manual Moderno. México, D.F. 1999, 1080 p.

Siwicki K, Studnicka M, Ryka B. Phagocytic ability of neutrophils in carp. *Bamidgeh* 1985, 37:123e8

Taoka Y, Maeda H, Jo J, Kim S, Park S, Yoshikawa T, Sakata T. Use of live and dead probiotic cells in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fisheries Sci* 2006, 72: 755–766.

Verdenelli MC, Ghelfi F, Silvi S, Orpianesi C, Cecchini C, Cresci A. Probiotic properties of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei* isolated from human faces. 2009. *Eur J Nutr*, 48 (6):355-363.

Vinderola CG, Reinheimer JA. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Res Int* 2003, 36:895–904

Westphal O, Jann. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further applications of this procedure. *Methods Carbohydr. Chem* 1965,5:83–91.

CAPÍTULO III
EFFECTO PROTECTOR DE DIETAS IMMUNOESTIMULANTES CON β -
GLUCANOS y *Lactobacillus casei* ANTE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL
CON *Aeromonas hydrophila*

Vásquez-Piñeros MA¹

¹Bióloga Marina, Esp. CMSc Grupo de Investigación en Sanidad de Organismos
Acuáticos, IALL.

Email: mandreavasquez@gmail.com

RESUMEN

Las bacterias oportunistas como *A. hydrophila* se relacionan con brotes de septicemia hemorrágica en tilapias de cultivo en nuestro país, siendo los agentes etiológicos de mayor participación en el diagnóstico de enfermedades infecciosas en cultivos de *Oreochromis sp.*, en el Departamento del Meta. Este capítulo describe tres experimentos, el primero consiste en el intento de replicación de la enfermedad por *A. hydrophila* a través de inmersión en suspensión bacteriana, y posterior confirmación a través del examen anatomopatológico de estómago e intestino y sobrevivencia. Adicionalmente, reporta la dosis letal 50 (LD₅₀) de la cepa experimental por inyección intraperitoneal en alevinos de tilapia híbrida. Finalmente, establece el grado de protección de dietas con suplementos de β -glucanos y *Lactobacillus casei*, previamente evaluadas y seleccionadas por su efecto positivos sobre el sistema inmune, y el mejoramiento de la resistencia ante el desafío intraperitoneal de *A. hydrophila*, después de dos semanas de suministro.

Los resultados mostraron que a pesar de la aparición de signos clínicos posterior al baño con *A. hydrophila* y algunas lesiones microscópicas leves, la técnica de infección no fue suficiente para causar la replicación de la enfermedad en la primera

etapa de estudio. Posteriormente se realizó una infección mediante inyección intraperitoneal, determinando previamente la dosis letal LD₅₀. Se estableció que la LD₅₀ para la cepa de *Aeromonas hydrophila* en alevinos de tilapia híbrida fue de $1,1 \times 10^{7,6}$ UFC por pez en ocho días, teniendo en cuenta, esta concentración para la evaluación de la protección de la dieta inmunoestimulante. Durante la determinación del efecto protector, la dieta con β -glucanos y *L. casei* suministrada durante dos semanas a alevinos de tilapia híbrida, otorgó un índice relativo de supervivencia del 24%, mayor que los animales control.

Este trabajo complementa los resultados de estudios de evaluaciones tanto *in vitro*, como *in vivo* de la dieta inmunoestimulante de β -glucanos y *L. casei* realizados en el estudio anterior, el cuál confirman que el incremento de la explosión respiratoria, el incremento de linfocitos y la activación de centros melanomacrófagos en bazo, reportados allí, repercute en un aumento a la resistencia a la infección por *A. hydrophila*.

Palabras clave: DL₅₀, infección experimental, tilapia híbrida, Inmunoestimulante, probiotico

ABSTRACT

Opportunistic bacteria as *A. hydrophila* are related to haemorrhagic septicaemia outbreaks in cultured tilapias in our country, being the aetiological agents of highest participation on the diagnosis of infection disease in cultures of *Oreochromis sp.*, in Departamento del Meta. This chapter described three trials, the first one, consist in the attempt of disease replication of *A. hydrophila* through dive in bacterial suspension, through anatomopatological evaluation of stomach and intestine and survival. Additionally, it is reported the lethal dosis LD₅₀ of experimental strain by intraperitoneal inyection in fry hybrid tilapia. Finally, it is test the level of protection of diets with supplies of β -glucanos and *Lactobacillus casei*, previously evaluated and selected because its positives effects on immune system, and the improvement of

resistance of intraperitoneal challenge with *A. hydrophila*, after two weeks of feeding. Results showed, that in spite of appearance of clinical signs and slight microscopical lesions, the technique was not enough to cause the disease replication for it is use as model to evaluated protection of the immunostimulants diet tested during the first phase. An infection through intraperitoneal inyection was made, determinating the lethal dosis 50 LD₅₀. in fry hybrid tilapia, that was reported as, $1,1 \times 10^{7,6}$ UFCper fish in 8 days, taking on count this concentration to asses the protection of the immunostimulants diet. To finish, the diet with β -glucanos y *L. casei* supplied for two weeks to fry hybrid tilapia, gave a suvival relative index of 24%, higher that control groups.

This work it is a complement, of results about *in vitro* and *in vivo* test of the immunostimulant diet with β -glucanos y *L. casei* made in the previus study; that confirms that the increase of respiratory burst, the increase in lymphocytes and the MMC activation, reported there, have repercussions in an increase of *A. hydrophila* disease resistance.

Key words: LD₅₀, experimental infection, bacterial disease, hybrid tilapia, disease resistance.

INTRODUCCIÓN

Aeromonas hydrophila, se considera uno de los agentes etiológicos más importantes de enfermedades bacterianas en peces, asociados a altas mortalidades en los cultivos. Estas bacterias oportunistas hacen parte de la flora intestinal de peces y otros animales poiquiloterms (Cipriano, 2001) y pueden causar enfermedad en animales bajo condiciones de estrés. En peces se describen tres tipos de presentación clínica: septicémica (aguda), cutánea (crónica) y latente (Iregui *et al.*, 2004). Algunos estudios han reportado que la bacteria, puede ingresar al hospedero por una o más de tres rutas diferentes, piel, branquias y tracto gastrointestinal (Ringo *et al.*, 2004). Dentro de los principales factores de virulencia de la bacteria se encuentra algunos productos extracelulares como las enterotoxinas, hemolisinas y proteasas (Cahill 1990; Zhang *et al.*, 2000). Estos aunados a componentes bacterianos como el flagelo, pilli, adhesinas, polisacáridos capsulares y la capa S, que podrían interactuar de manera individual o conjunta para la adhesión y posterior invasión de la bacteria. Trabajos *in vivo* en los cuáles se inocularon intraperitonealmente *A. hydrophila* en *Oreochromis sp.*, y *Piaractus brachypomus*, han mostrado generación de cambios hemodinámicos, sistémicos y locales asociados también a productos extracelulares (PEC) de la bacteria (Rey *et al.*, 2009).

Una de las especies de cultivo del Departamento del Meta, más afectada por enfermedades infecciosas causadas por *Aeromonas hydrophila* es la tilapia híbrida, posicionada como la principal especie de cultivo del país (FAO, 2006), En este Departamento, *Aeromonas spp.*, es el principal agente causal de enfermedades infecciosas en peces con prevalencias del 20% en el diagnóstico de infecciones bacterianas (Iregui *et al.*, 2004).

Por otro lado, como se abordó en el primer y segundo capítulo, los inmunoestimulantes han despertado gran interés dentro del sector piscícola, para el control y manejo de las enfermedades de tipo infeccioso. Para establecer que una

sustancia posee propiedades inmunoestimulantes y propicie el incremento de la resistencia a patógenos, es necesario establecer el alcance de la investigación para la elección del inmunoestimulante, obtención y métodos de aplicación, lo que se puede llevar a cabo mediante ensayos *in vitro*; una vez establecido el potencial de las sustancias se llevan a cabo las evaluaciones *in vivo*, que tengan en cuenta las respuesta celular, humoral o la respuesta sobre la modulación de la expresión génica que afecte el sistema inmune inespecífico relacionado con el suministro de los inmunoestimulantes; temas, abordados en parte, durante la primera etapa de este trabajo. Por último, y teniendo en cuenta el contexto de la problemática sanitaria, es indispensable soportar los estudios anteriores con trabajos determinantes que evalúen el grado de protección de las sustancias o bacterias de interés ante patógenos de importancia, a través de infecciones experimentales, evaluando la supervivencia de los peces como uno de los argumentos con mayor validez para poder recomendar el uso de suplementos inmunoestimulantes de la dieta de peces.

Teniendo en cuenta el contexto departamental, el presente trabajo tuvo como propósito evaluar el efecto protector de una dieta con suministro de β -glucanos y *L. casei*, como potenciales inmunoestimulantes en tilapias híbridas desafiadas con *A. hydrophila*; estableciendo previamente las técnicas adecuadas y dosis necesarias para la replicación de la enfermedad causada por *A. hydrophila*.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto protector de la dieta inmunoestimulante de β -glucanos y *L. casei* en alevinos de tilapias híbridas (*Oreochromis sp*) desafiados con *A. hydrophila*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar una técnica de infección experimental por inmersión con *Aeromonas hydrophila*, para involucrar las mucosas como vías de ingreso del patógeno, a través de la determinación de lesiones microscópicas en intestino y estómago.

Determinar la dosis letal 50 (LD₅₀) para desafío intraperitoneal de *Aeromonas hydrophila* en alevinos de tilapia híbrida.

Evaluar el porcentaje relativo de supervivencia de alevinos de tilapia alimentados con una dieta suplementada con β -glucanos y *L. casei* luego de dos semanas de alimentación, desafiados con *A. hydrophila*.

MATERIALES Y MÉTODOS

INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE *Aeromonas hydrophila* EN TILAPIA HÍBRIDA POR INMERSIÓN

Animales experimentales

Treinta alevinos de *Oreochromis* sp., con peso entre 4,7 a 5,2 g provenientes de un mismo lote y adquiridos de una granja comercial del Departamento del Meta fueron trasladados al Laboratorio de Bioensayos del Instituto de Acuicultura de los Llanos (IALL), Universidad de los Llanos. Los alevinos se ubicaron en acuarios de vidrio de 54 L; mantenidos a una densidad no mayor a 1 g/L, con aireación constante y bajo condiciones controladas. Los animales se sometieron a un periodo de aclimatación mínimo de 96 horas, donde se mantuvieron en ayuno previo al periodo experimental.

Cepas bacterianas

La cepa de *A. hydrophila* AhTiAi09-44 aislada de tilapias e identificada previamente mediante pruebas bioquímicas y moleculares, fue donada por el Laboratorio de Patobiología Veterinaria de la Universidad Nacional. La bacteria se mantuvo congelada en viales de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) con glicerol al 20% a -20°C, hasta su uso.

Incremento de la virulencia y preparación de inóculos

Se incrementó la virulencia de *A. hydrophila*, mediante cinco pasajes por tilapia híbrida a través de la inoculación intraperitoneal de 100 µl de una solución madre de aproximadamente 10^9 UFC/ml (escala de Mc Farland), para posterior aislamiento

de las bacterias a partir de órganos como: hígado, riñón y bazo, en agar TSA, incubando a 28°C por 24 horas (Jiménez *et al.*, 2008).

Una vez obtenida la cepa virulenta, se recolectó la biomasa bacteriana mediante siembras masivas en agar TSA, y recolectada con solución salina estéril. La concentración se cuantificó a través de diluciones seriadas (1:10) en solución salina al 0.85%, siembra en placa por duplicado y posterior incubación a 28°C por 24 horas para conteo en placa en agar triptona soya (TSA) (Jiménez *et al.*, 2008). Para disminuir el error del investigador, se aplicó la fórmula de corrección para recuento en placa, según APHA (1984):

$$N = C \Sigma / [(1 * n_1) + (0,1 * n_2)] * (d)$$

Donde N = Número de colonias por gramos de producto

ΣC = Suma de todas las colonias en todas las placas contadas (de 30 a 300 UFC)

n_1 = Número de placas en la primera dilución contados

n_2 = Número de placas en la segunda dilución contados

d = Dilución de la que los primeros recuentos se obtuvieron

La concentración bacteriana se ajustó para obtener una concentración final de 5.8×10^{11} UFC en dos litros de solución salina.

Infección experimental por inmersión

Se prepararon 4L de solución salina a la cual se le incrementó la temperatura a 29°C para generar condición de estrés, posteriormente se dividió en dos contenedores con 2 l de solución salina cada uno, en donde a uno se le adicionó una solución con concentración final de $2,3 \times 10^{11}$ UFC de *A. hydrophila*, el otro baño se colocó 9 ml adicionales de solución salina sin bacteria como control. Los alevinos se sometieron previamente a un minuto y medio al aire para estresarlos y predisponerlos a la infección, posteriormente se iban colocando uno a uno en los

diferentes recipientes, 10 peces en cada recipiente, mantenidos en baño por una hora (modificado Wei-Hua y Cheng-Ping, 2008). Posterior al baño, los peces se colocaron en acuarios con una temperatura del agua de 26°C (3 grados menor al baño, como factor adicional de estrés) para observación clínica y posterior toma de muestras de intestino y estómago.

Toma de muestras y análisis microscópico

Posterior al baño, cada 2 horas hasta las 18 horas, dos peces por tratamiento y dos peces control fueron insensibilizados con hielo y sacrificados mediante sección de la médula espinal, dorsal a los opérculos. Después del sacrificio de cada animal, se realizó examen macroscópico y los órganos (intestino y estómago) se fijaron por inmersión en formalina buferada al 10%. Posteriormente, se procesaron por la técnica histológica de rutina para H&E para su análisis microscópico.

Animales experimentales

Cuarenta alevinos de *Oreochromis* sp., con peso entre 4,9 a 5,5 g provenientes de una granja comercial del Departamento del Meta fueron trasladados al Laboratorio de Bioensayos del Instituto de Acuicultura de los Llanos (IALL), Universidad de los Llanos. Los alevinos se ubicaron en acuarios de vidrio de 54 L; mantenidos a una densidad no mayor a 1 g/L, con aireación constante y bajo condiciones controladas. Los animales se sometieron a un periodo de aclimatación de ocho días, alimentados al 1% de la biomasa total.

Se realizó un control sanitario, tomando muestras para análisis histopatológico de hígado, riñón, bazo y cerebro, a diez peces del lote experimental, después de siete días del traslado al laboratorio para asegurar el buen estado de salud de los peces.

Cepas bacterianas virulentas y preparación de inóculos

Se utilizaron inóculos virulentos de la cepa de *A. hydrophila* AhTiAi09-44, siguiendo el protocolo mencionado anteriormente, ajustando la concentración mediante el recuento en placa y corregido según la APHA (1984)

Dosis letal 50 para *Aeromonas hydrophila* en tilapia híbrida

Se tomaron 5 concentraciones bacterianas a partir del inóculo calculado, según ensayos preliminares, que causaran porcentajes mayores y menores al 50% de la mortalidad del total de la población. De cada uno de los tubos de concentración conocida, mediante el previo recuento en placa y corrección del valor de viabilidad obtenido según la APHA (1984), se tomó 100 μ l para la aplicación intraperitoneal, cada concentración se aplicó a un grupo de diez peces, adicionalmente se incluyó un control negativo inoculando 100 μ l de SSFE. Diariamente se registró la mortalidad durante ocho días y se calculó la LD 50 según Reed and Much (1938).

Efecto protector de la dieta con *Lactobacillus casei* y β -glucanos suministrado a tilapias retadas intraperitonealmente con *Aeromonas hydrophila*.

Para la evaluación del efecto protector de la dieta con la mezcla de *L. casei* y β -glucanos, se tomaron 60 alevinos de tilapia híbrida con peso promedio entre 3,9 y 5,2 g, treinta peces se alimentaron con la dieta inmunoestimulante y treinta con la dieta control siguiendo el protocolo para la preparación de las dietas del capítulo 1. Al cabo de dos semanas de alimentación cada grupo se dividió en dos subgrupos, para la realización del reto intraperitoneal con la LD₅₀ de *A. hydrophila*, siguiendo la metodología de la LD₅₀, de la siguiente manera: grupo 1: peces alimentados con la dieta control e inyectados con SSFE (control negativo dieta control); grupo 2: peces alimentados con la dieta control e inyectados con la LD₅₀ de *A. hydrophila* (control positivo dieta control); grupo 3: peces alimentados con la dieta inmunoestimulante e inyectados con SSFE, grupo 4 (control negativo dieta experimental): peces

alimentados con la dieta inmunoestimulante y retados con la LD₅₀ de *A. hydrophila* (control positivo dieta experimental). Cada tratamiento consistió en diez peces divididos en dos acuarios, con dos réplicas cada uno. Diariamente durante ocho días se registró la mortalidad y se determinó el porcentaje relativo de supervivencia (PRS).

La viabilidad de la dieta fue determinada mediante la realización de diluciones en base diez y recuento de células viables en placa, como se ha descrito anteriormente.

Análisis estadístico

Para la evaluación de la replicación de la enfermedad se realizó análisis descriptivo de la lesión, como leve, moderada o severa.

La determinación de la dosis letal para inyección intraperitoneal se calculó a partir del método de Reed and Muench (1938), en donde:

$$\text{Índice} = \frac{\% \text{ Acumulado de Muertos en la dilución inmediatamente sobre } 50\% - 50\%}{\% \text{ Acumulado muertos en la dilución sobre el } 50\% - \% \text{ Acumulado muertos en la dilución por debajo del } 50\%}$$

Índice: Dilución con suspensión bacteriana que contiene LD₅₀

Índice se adiciona a la potencia de la dilución bacteriana que posee una LD₅₀.

El efecto protector ante la bacteria de la mezcla inmunestimulante suministrada se calculó como porcentaje relativo de supervivencia (Ellis 1988), en donde:

$$\text{RPS} = 1 - \frac{\% \text{ Mortalidad grupo dieta inmunoestimulante retado con } A. \textit{hydrophila}}{\% \text{ Mortalidad grupo dieta control retado con } A. \textit{hydrophila}} \times 100$$

RESULTADOS

Los peces expuestos por inmersión a la bacteria patógena, evidenciaron boqueo y aumento de frecuencia opercular en mayor medida que animales no expuestos. Adicionalmente el grupo expuesto mostró letargia durante las 18 horas post-exposición y se les observó pérdida de moco y algunas escamas.

Las lesiones microscópicas observadas en estómago e intestino, se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Resumen de los hallazgos microscópicos encontrados en intestino y estómago de animales expuestos, según su aparición por horas después del baño con *A. hydrophila* y control. Se describe la lesión como leve +, moderada ++ o severa +++.

TIEMPO POST-EXPOSICION (HORAS)	LESIONES MICROSCÓPICAS EN INTESTINO	LESIONES MICROSCÓPICAS EN ESTÓMAGO
0	Edemas mucosa +	
0	Edema lámina propia +	
0	Incremento secreción moco lumen +++	Incremento secreción moco en lumen +++
2	Cambios microcirculatorios +	Edema mucosa +
4	Infiltración de CGE ++	
4	Cambios microcirculatorios ++	Cambios microcirculatorios +
4	Infiltración lámina propia +	Infiltración lámina propia +
6	Edema de lámina propia ++	
8	Vacuolización +	

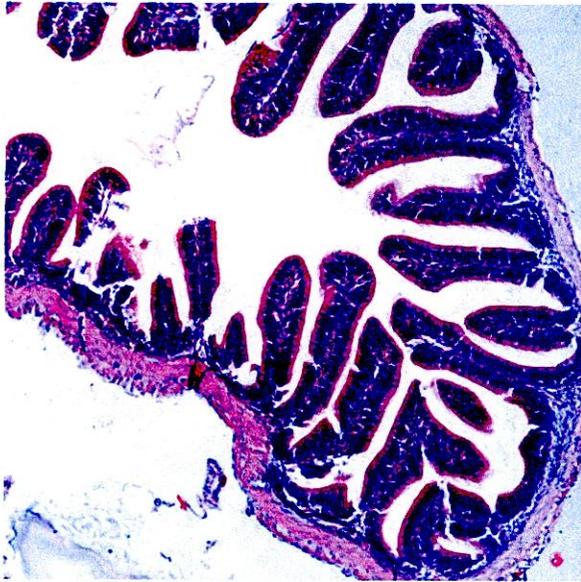


Figura 1. Intestino de animales control, posterior al baño. 100x

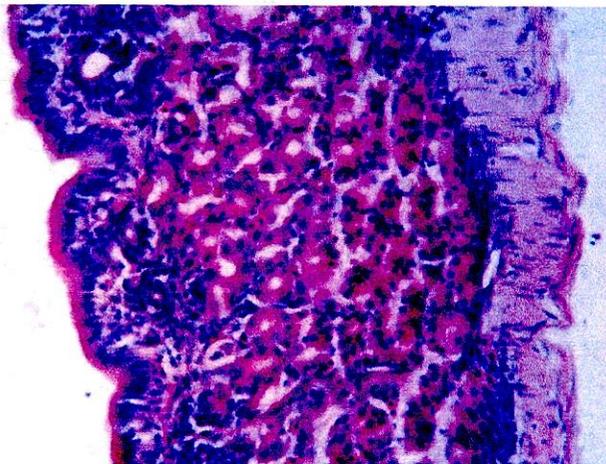


Figura 2. Estómago control post-baño 8 horas *A. hydrophila* 400x

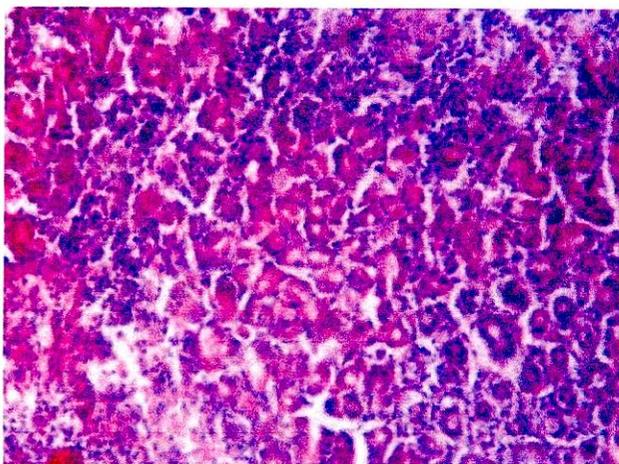


Figura 3. Submucosa estómago pos-baño hora 0. *A. hydrophila* 400x.

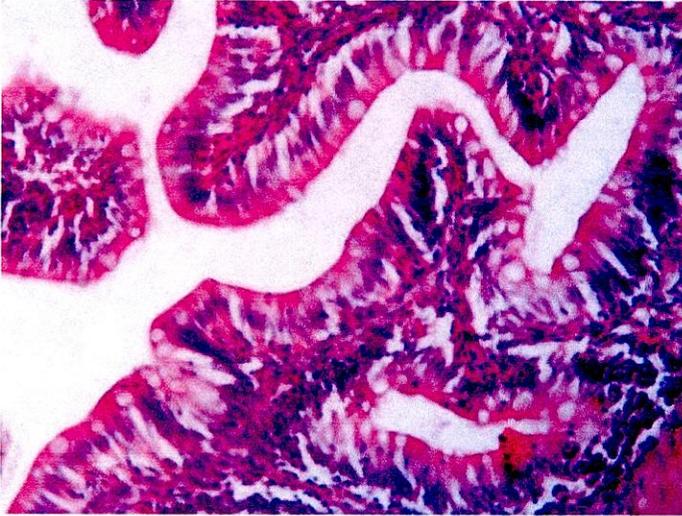


Figura 4. Intestino peces 6 horas post-baño con *A. hydrophila*.

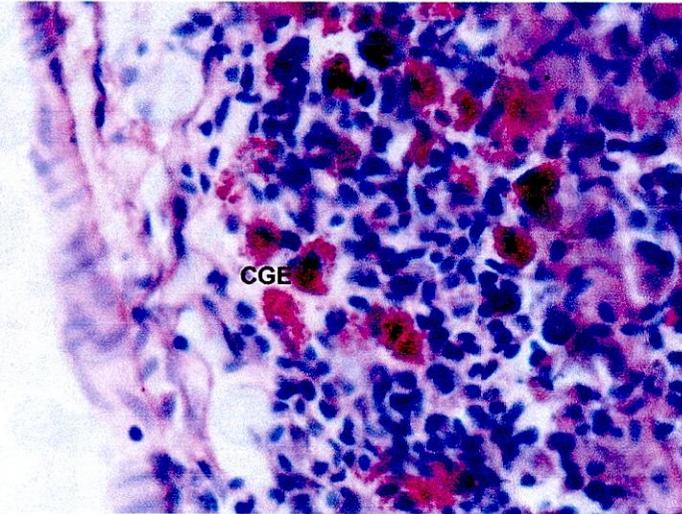


Figura 5. Lámina propia de la mucosa estómago 6 horas posterior al baño con *Aeromonas hydrophila*. leve congestión y presencia de CGE. 1000x.

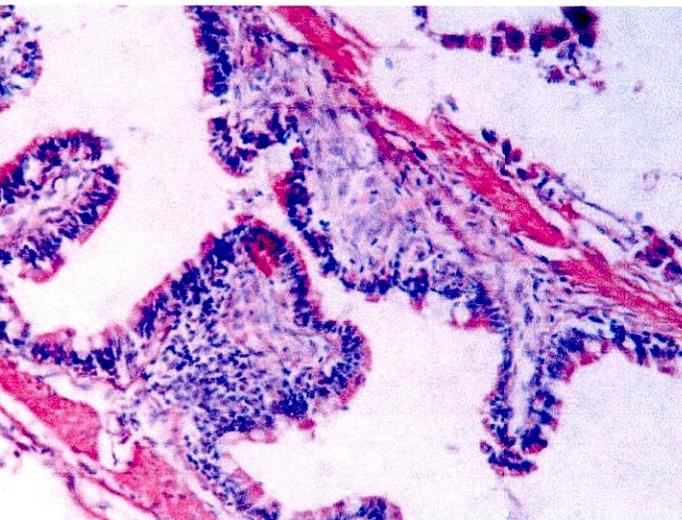


Figura 6. Intestino peces 6 horas post-baño con *A. hydrophila* 400x.

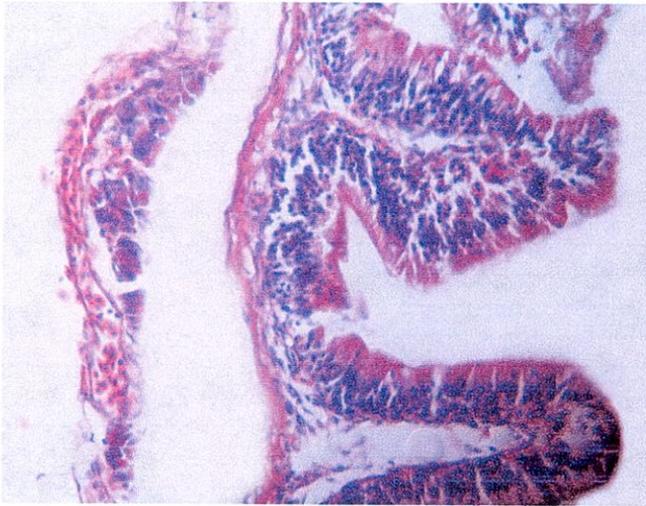


Figura 7. intestino peces 8 horas post-baño con *A. hydrophila* 400x.

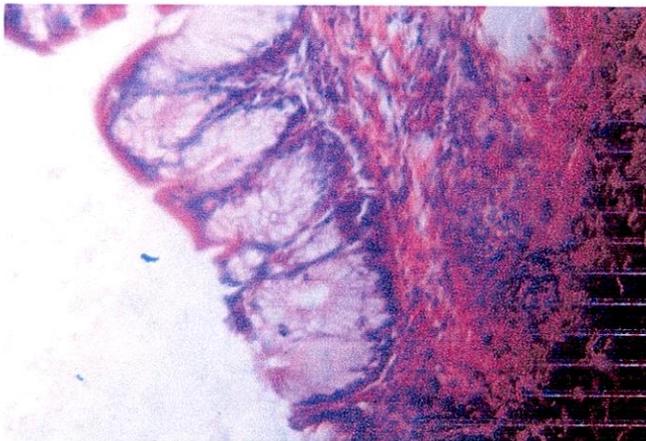


Figura 8. Estomago con leve infiltrado en lámina propia post-baño *A. hydrophila* hora 8.

LD₅₀ de *Aeromonas hydrophila*

Preparación inóculo bacteriano

De acuerdo al conteo en placa, se obtuvo que 300 mg del peso húmedo de la bacteria diluido en 1200 µl de solución (solución madre), contenía los valores en UFC/placa registrados en la tabla 2:

Tabla 2. Valores de UFC/placa de los recuentos de viables realizados en las diferentes diluciones de la solución madre

Recuento	Log 10 dilución		
	-9	-8	-7
UFC/placa	91	15	1
	123	25	2

Aplicando la corrección según APHA (1984):

$$N = C \Sigma / [(1 * n_1) + (0,1 * n_2)] * (d)$$

Donde N = Número de colonias por mililitro de solución

ΣC = Suma de todas las colonias en todas las placas contadas (de 30 a 300 UFC)

n_1 = Número de placas en la primera dilución contados

n_2 = Número de placas en la segunda dilución contados

d = dilución de la que los primeros recuentos se obtuvieron

$$N = \frac{91 + 123}{(1*2) + (0,1*0) * 10^9} = \frac{214}{2} = 107 \times 10^9 = 1,1 \times 10^{11} \text{ UFC/ml}$$

$1,1 \times 10^{11}$ UFC/ml posee la solución madre.

Dosis letal 50 intraperitoneal para *Aeromonas hydrophila* en tilapia híbrida

De la solución madre, se tomó el quinto, sexto, séptimo y octavo tubo de las diluciones seriadas en base 10, correspondiente a la dilución 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9} (de acuerdo al recuento en placa). Se tomó 100 μ l de cada uno de los tubos para la aplicación intraperitoneal a los peces de cada grupo, después de ocho días se obtuvieron los valores reportados en la tabla 2.

Tabla 3. Valores del promedio de número de peces muertos, vivos, porcentajes y valores acumulados de peces inyectados con diferentes concentraciones de *A. hydrophila*.

Log 10 dilución	N° muertos	N° vivos	Valores Acumulados		SUMA A + B	% Mortalidad A/(A+B)*100
			Muertos (A) ↑	Vivos (B) ↓		
-9	10	0	21	0	21	100
-8*	9	1	11	1	12	92
-7	2	8	2	9	11	18
-6	0	10	0	19	19	0

↑↓: Indica el sentido de adición para el valor acumulado

* Indica la dilución que contiene porcentaje sobre el 50% de mortalidad

Normalmente el 50% del efecto buscado no corresponde exactamente a una de las diluciones de trabajo, se hizo necesario hacer una interpolación matemática para definirla. El método más empleado para este fin es el de Reed y Muench (1938), este método que se basa en la suposición de que el número de unidades de prueba afectadas varía proporcionalmente al \log_{10} de la dilución, es decir que a diluciones menores (mayor concentración bacteriana) el porcentaje de efecto será mayor que a diluciones mayores (menor concentración bacteriana). Además, se supone que en la zona cercana al 50% de efecto, éste varía linealmente con la dosis. Para esto se calculó:

$$LD\ 50 = \frac{(\% \text{ Acumulado de Muertos en la dilución inmediatamente sobre } 50\% - 50\%)}{(\% \text{ Acumulado muertos en la dilución sobre el } 50\% - \% \text{ Acumulado muertos en la dilución por debajo del } 50\%)}$$

$$LD\ 50 = \frac{92-50}{92-18} = 0,6$$

Se aplicó el índice calculado adicionándolo a la potencia de la dilución que produce mortalidad sobre el 50%, entonces = $10^{8+0,6} = 10^{8,6}$

Como se aplicó 100 μ l por pez de la dilución, la mortalidad corresponde a un volumen 10 veces menor que el volumen calculado, finalmente se obtiene: $10^{7,6}$ UFC/pez.

Entonces, según el recuento final de placa se obtiene una LD_{50} para la cepa experimental de *Aeromonas hydrophila* en tilapia híbrida de $1,1 \times 10^{7,6}$ UFC por pez en ocho días..

Los peces inoculados con solución salina estéril utilizados como control no presentaron mortalidad.

Efecto protector de la dieta con *Lactobacillus casei* y β -glucanos suministrado a tilapias retadas con *Aeromonas hydrophila*.

A la segunda semana, después de la alimentación con las dietas experimentales, se inyectaron los peces desafiados con *A hydrophila* en concentraciones de $9,1 \times 10^6$ /pez (corregido por método APHA, 1984).

Tabla 4. Promedio del porcentaje de mortalidad de los grupos de control negativo (inyectados con SSFE) y control positivo (inyectadas con LD50 de *A. hydrophila*) de dietas control y dieta inmunoestimulante.

Dieta control		Dieta Experimental	
Control	Desafío	Control	Desafío
1%	92%	1%	70%

Los controles negativos correspondientes a la inoculación con solución salina estéril, mostrarán para ambas dietas (dieta control y dieta tratamiento) el 1% de mortalidad. Para el caso de los controles positivos, es decir los inoculados con una LD 50 de *A. hydrophila*, se observó una mortalidad del 92% para la dieta control y 70% para la dieta tratamiento. Así aplicando el porcentaje relativo de supervivencia (Ellis, 1988):

$$PRS = 1 - (70\%/92\%) * 100$$

$$PRS = 24\%$$

Se obtiene un porcentaje relativo de protección del 24% conferido por la dieta experimental suplementada con la mezcla de *Lactobacillus sp* y β -glucanos.

DISCUSIÓN

Infección experimental de *Aeromonas hydrophila* en tilapia híbrida por inmersión

La defensa más efectiva de un organismo involucra la protección contra el ingreso de microorganismos a través de las mucosas, sin las barreras físicas una defensa exitosa no sería posible. Además de las barreras físicas superficiales existen algunos factores inmunes innatos que hacen parte de tal protección y juegan un papel importante en el sistema de defensa de los peces (lectinas y otras proteínas de adhesión a carbohidratos en el moco, inmunoglobulinas, marcadores de células T, citoquinas y factores de complemento) (Rombout *et al.*, 2010; Tizard 2009). Para poder producir enfermedad las bacterias patógenas deben enfrentarse y sobrevivir a estas primeras barreras de defensa. Para el entendimiento de esta relación se hace necesario estudiar modelos de invasión y patogénesis que involucren las barreras físicas como piel o intestino, los cuáles son las principales rutas de ingreso de muchos patógenos en peces.

Los resultados mostraron que a partir de las primeras hora post-inmersión con *A. hydrophila*, los animales presentaron incremento en la producción de moco en el intestino y estómago. En los trabajos de Schroers *et al.* (2009), luego de la aplicación oral de diferentes cepas *A. hydrophila* a la carpa común (*Cyprinus carpio*) encontraron que la cepa de menor virulencia incrementó la cantidad total de glicoproteínas del moco, al contrario que cepas más virulentas que son capaces de degradar las glicoproteínas del moco y por tanto dañar la capa de moco, desestabilizando la barrera intestinal. Un incremento en la secreción del moco se considera que permite la eliminación de bacterias invasoras junto con el moco hacia el lumen intestinal (Schroers *et al.*, 2009). Reacción que se observó en mayor medida durante las primeras horas post-infección.

A partir de la segunda y cuarta hora post-exposición en intestino y estómago se empezaron a evidenciar cambios leves microcirculatorios en mucosas y lámina propia principalmente, cambios como: edema en lámina propia y edema intraepitelial, cambios microcirculatorios moderados (a partir de la cuarta hora), como: edematización leve; cambios que también se reportan durante las primeras horas en infecciones con *A. hydrophila* administrada intraperitonealmente (Rey, 2002). A partir de las 10 horas esta autora reporta focos severos de hemorragias en mucosa, serosa y muscular y presencia de bacterias, que no se apreciaron en el presente estudio, puede ser debido a la vía de administración, en donde los mecanismos de defensa en el intestino pudieron evadir la colonización y establecimiento de la bacteria y por tanto las lesiones típicas generadas por este patógeno.

A pesar que reportes previos de Wei-Hua y Cheng-Ping (2008), durante la administración *A. hydrophila* marcada con proteína verde fluorescente, en baño a carpas (*Carassius auratus gibelio*) sin y con injurias en piel y con remoción de moco, los autores reportaron que el mayor número de bacterias se encontró en tejidos hacia las dos horas post-exposición, adicionalmente los resultados indicaron que en peces intactos, la piel no es la principal ruta de entrada de la bacteria y los principales órganos afectados branquia e intestino. Sin embargo en el presente estudio no fue posible la detección de la bacteria en las superficies epiteliales de las mucosas con la técnica utilizada (H&E).

No se tienen reportes de lesiones microscópicas causadas por exposición por inmersión de *Aeromonas hydrophila* en peces, por lo que el actual reporte presenta un primer avance en este tipo de estudio, resulta importante darle continuidad utilizando técnicas de inmunohistoquímica u otro tipo de marcación para seguir de manera detallada la interacción de la bacteria con las mucosas del hospedero.

A pesar de que se evidenciaron algunas lesiones microscópicas leves, durante la infección por inmersión, esta técnica no fue suficiente para causar mortalidades o

para evidenciar lesiones moderadas o severas compatibles con septicemias o presentaciones dérmicas generadas por *Aeromonas hydrophila* y por tanto no fue posible en el presente experimento usar la técnica para evaluar protección de la dieta inmunoestimulante. Por tal razón se procedió a utilizar una infección experimental mediante inyección intraperitoneal, determinando previamente la dosis infectiva LD₅₀.

Dosis letal 50 para *Aeromonas hydrophila* en tilapia híbrida

La LD₅₀ de *A. hydrophila*, en peces obtenida en el presente trabajo, con valor de $1,1 \times 10^{8,6}$, fue mayor a lo reportado para otras especies foráneas, como lo descrito por Jun *et al.*, (2010) en el pez coreano *Misguinus anguillicaudatus* con LD₅₀ de 6×10^7 UFC/pez; Pachanawan *et al.*, (2008) con $3,44 \times 10^5$ UFC/ml en tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*); $2,3 \times 10^4$ en 30 días en goldfish (*Carassius auratus*) (Harikrishnan *et al.*, 2010), esta dosis presenta menores valores que lo reportado para especies de aguas cálidas tropicales como la Matrinxã (*Brycon amazonicus*), con una LD₅₀ de $6,66 \times 10^{11}$ cel/ml (Oliviera *et al.*, 2011).

Efecto protector de la dieta con *Lactobacillus casei* y β-glucanos suministrado a tilapias posteriormente retadas con *Aeromonas hydrophila*.

Los inmunoestimulantes son sustancias que potencian el sistema inmunitario y por tanto aumentan la resistencia frente a enfermedades infecciosas, por aumentar en rapidez y prolongar la actividad de la respuesta inmunitaria inespecífica, los estudios planteados para su identificación *in vitro* no son suficientes, pues dan poca información del efecto inmunoestimulante en el organismo completo. Evaluaciones *in vivo* se hacen necesarias para revelar tal efecto sobre los mecanismos de defensa inespecíficos, a través de la evaluación de la respuesta tanto humoral como celular, sin embargo estos procesos poseen una complejidad y variabilidad biológica, en donde no todas las veces se obtienen resultados consistentes

(Rodríguez *et al.*, 2009; Raa, 2000), por eso una de las herramientas más confiablemente utilizada es el uso de infecciones experimentales con patógenos de interés.

Durante el presente estudio se evaluó el efecto de la dieta con mezcla de *L. casei* y β -glucano, a través de la infección experimental con *A. hydrophila*. Dada su importancia en el ámbito regional, *A. hydrophila* se encuentra entre los agentes causales más importantes de enfermedades infecciosas en Colombia junto con otras bacterias como, *Streptococcus agalactiae* y *Edwardsiella tarda* y *Flavobacterium columnaris* para peces de aguas cálidas (Iregui *et al.*, 2004; Rey 2002). Por esta razón es importante determinar además de los estudios de patogénesis de esta bacteria, herramientas alternativas al uso de fármacos para el control de esta enfermedad.

Las bacterias del género *Aeromonas* son bacterias esencialmente ubicuas, se puede aislar en casi cualquier ambiente donde existen poblaciones bacterianas, nichos como: ambientes acuáticos, peces, alimentos, aves, invertebrados e insectos (Janda y Abbott, 2010). *Aeromonas hydrophila* se caracteriza por ser un patógeno oportunista, habitante normal de la flora acuática y tracto gastrointestinal de animales acuáticos y terrestres (Cipriano, 2001), adicionalmente se ha encontrado que puede afectar diferentes especies de peces, anfibios, humanos y otros mamíferos (Cipriano, 2001; Janda y Abott, 2010). En peces se describen tres tipos de presentación clínica: septicémica (aguda), cutánea (crónica) y latente (Iregui *et al.*, 2004). Debido a la importancia y el impacto sobre la industria piscícola, la bacteria ha sido ampliamente utilizada en estudios de patogénesis (Rey *et al.*, 2009), resistencia a antibióticos (Jun *et al.*, 2010) y diversos tratamientos para aumentar la resistencia de los peces a la bacteria (Pachanawan *et al.*, 2008; Harikrishnan *et al.*, 2010; Rodriguez *et al.*, 2009; El-Boshy *et al.*, 2010; Kumari y Sahoo, 2006), entre otros.

El efecto de sustancias inmunoestimulantes, entre los cuáles se encuentran también los probióticos, han sido evaluadas con anterioridad para determinar el incremento en la resistencia de enfermedades de tipo infeccioso. Para el caso de β -glucanos de *Saccharomyces cerevisiae* y *Lactobacillus sp*, principalmente se ha evaluado su efecto mediante el suministro individual de cada una de estas sustancias.

Estudios sobre el suministro de β -glucanos, han demostrado que la mortalidad debida a la infección por *Aeromonas hydrophila*, se reducía mediante la inyección a diferentes concentraciones de β -glucanos (0,5; 2 y 5 mg/ml) provenientes de *Saccharomyces cerevisiae* durante el segundo, cuarto y sexto días previo al desafío (Rodriguez *et al.*, 2009). El-Boshy *et al.*, (2010), reportaron que durante el suministro de raciones suplementadas con *Sacharomyces cerevisiae*, β -glucanos y laminaria en la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) inmunosuprimidos con mercurio, el suministro de β -glucanos mejoró de manera importante la resistencia ante la infección bacteriana *Aeromonas hydrophila*. Choudhury *et al.*, (2005) reportaron que la incorporación del 0.4% de ácido ribonucleico de levadura en la dieta de juveniles de *Labeo rohita*, mejoró también la resistencia a *A. hydrophila*. Otros trabajos también han reportado que esta sustancia es capaz de mejorar la resistencia contra *A. hydrophila* en el catfish africano (*Clarias batrachus*) (Kumari y Sahoo, 2006) y la carpa común, suministrado solo o en mezclas con LPS (*Cyprinus carpio*) (Selvaraj *et al.*, 2005; Selvaraja *et al.*, 2006).

Entre los mecanismos de acción de los β -glucanos, se ha estudiado que son capaces de unirse a moléculas receptoras en la superficie de los fagocitos (Engstad y Robertsen, 1994). Una vez la sustancia es reconocida, las células empiezan a volverse más activas en el proceso de endocitosis y destrucción de la bacteria, así como en la secreción de citoquinas, como moléculas de señalización que permiten ampliar la respuesta inmune. Dentro de los receptores capaces de reconocer los β -glucanos se encuentran los receptores de dectina 1 que actúan en conjunto con el TLR 2, permiten la secreción de IL-12 y IFN; también el reconocimiento puede estar

dado por la interacción de los receptores TLR2 y TLR 4, que permite la señalización vía MyD88, lo que desencadena una inmunidad mediada por células (Células Th, CD 4+, células Th1), activación de macrófagos y activación de células NK (Dalmo y Bøgwald, 2008), razón por la cual los β -glucanos también se utilizan ampliamente como adyuvantes, durante la administración de vacunas (Whittington, *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2009).

Muchos trabajos se han enfocado en evaluaciones *in vivo* suministrando diferentes cepas del género *Lactobacillus* en la dieta para protección contra patógenos. En trabajos de Ali *et al.*, (2010) se demostró que alevinos de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) suplementados en la dieta con *Lactobacillus and Bacillus* sp., tuvieron una respuesta inmune mayor y una mayor resistencia a la infección experimental con *Aeromonas hydrophila* comparados con el grupo control. Truchas (*Oncorhynchus mykiss*) con suplemento de *L. rhamnosus*, incrementó la resistencia a *Aeromonas salmonicida* (Nikoskelain *et al.*, 2003); el suministro de *L. rhamnosus* a tilapias nilóticas (*Oreochromis niloticus*), mejoró la sobrevivencia ante el desafío con *Edwardsiella tarda* (Nopadon *et al.*, 2006), el suministro de *L. acidophilus* a tilapias nilóticas incrementó la resistencia a *Aeromonas hydrophila* y *Streptococcus iniae* (Aly *et al.*, 2008), Balcázar *et al.*, (2006), mostraron que este mismo lactobacilo confirió mayor actividad fagocítica a *Oncorhynchus mykiss* ante *Aeromonas salmonicida* y Salinas *et al.*, (2008), demostró la resistencia de *Oreochromis niloticus* a *A. salmonicida*, a través del consumo de *L. delbrueckii* subsp *lactis*.

A pesar de los numerosos estudios acerca de los efectos de protección de probióticos contra patógenos, aun no se ha dilucidado completamente su mecanismo de acción, sin embargo, se han sugerido como probables: antagonismo (Verchuere *et al.*, 2000); competencia con patógenos por sitios de adhesión o por receptores (Balcázar *et al.*, 2006; Kekkoken, 2008; Verchuere *et al.*, 2000), producción de compuestos inhibitorios, competencia por energía disponible (Verchuere *et al.*, 2000, Nguyen *et al.*, 2008); y estimulación de la respuesta inmune

celular y humoral (Balcázar *et al.*, 2006, Nguyen *et al.*, 2008, Irianto y Austin, 2002; Kekkoken, 2008).

Para el caso de *L. casei*, se determinó que durante la administración de la bacteria en la dieta, el contenido de proteína del moco se incrementó en comparación con el grupo control (Hernández *et al.*, 2010). El contenido de proteína en el moco es un indicador de la cantidad de moco secretado y el incremento en esta indica la posibilidad de una mejor respuesta de defensa (Gómez y Balcázar, 2008; Hernández *et al.*, 2010). Por tanto el trabajo indicó que la inclusión de *L. casei*, contribuyó a reforzar la primera línea de defensa, en *P. gracilis* (Hernández *et al.*, 2010). Las propiedades de *L. casei*, como probiótico fueron demostradas por sus características *in vitro*, como se mencionó en el primer capítulo; producción de sustancias inhibitorias contra patógenos: *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* (Verdenelli *et al.*, 2008), *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Shigella dysenteriae* (Mishra y Prasad 2005); y como se reportó en el anterior capítulo de este estudio antagoniza también la bacteria patógena de estudio *Aeromonas hydrophila*. *L. Casei* adicionalmente posee la capacidad de sobrevivir el tránsito gastrointestinal y colonizar el intestino (Crittenden *et al.*, 2002; Verdenelli *et al.*, 2008); tolerar características del ambiente intestinal como bajos pH y sales biliares y presenta óptimas características de adhesión a enterocitos (Verdenelli *et al.*, 2008; Mishra y Prasad, 2005).

CONCLUSIONES

La técnica de infección experimental con *Aeromonas hydrophila* por inmersión con una concentración $2,3 \times 10^{11}$ UFC en dos litros de SSFE, y previa inducción de hipoxia y variación de temperatura como factores de estrés, no fue apropiada como técnica de replicación de la enfermedad producida por la bacteria, debido a que no induce lesiones importantes atribuibles al patógeno.

La dosis letal 50 (LD_{50}), intraperitoneal de la cepa *Aeromonas hydrophila* AhTiAi09-44, en tilapia híbrida es de $1,1 \times 10^{7,6}$ UFC por pez, en ocho días.

El presente estudio reporta que alevinos de tilapia híbrida (*Oreochromis sp*), alimentados con una dieta suplementada con β -glucanos y *L. casei* durante dos semanas de suministro, presentan un porcentaje relativo de supervivencia del 24%, superior a peces alimentados sin la mezcla, ante el desafío experimental con *Aeromonas hydrophila*.

BIBLIOGRAFIA

Ali HM, Ghazalahl A, Gehad EA, Hammouda YA, Abo-State HA. Practical aspects and immune response of probiotics preparations supplementes to Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) diets. *Nature and Science* 2010, 8(5): 39-45.

Aly S, Rahman A, John G, Mohamed M.hn, Mohamed F. Characterization of Some Bacteria Isolated from *Oreochromis niloticus* and their Potential Use as Probiotics, *Aquaculture* 2008; 277:1-6.

APHA. Asociación Americana de Salud Pública. Compendio de métodos para el examen microbiológico de los alimentos, 2^a ed. APHA, Washington, DC. 1984

Balcázar J. de Blas I, Zarzuela I, Cunningham D, Vendrell D, Muzquiz J. The role of probiotics in aquaculture. *Vet Microbiol* 2006; 114:173–186.

Cahill M. Virulence factors in motil *Aeromonas* species. *J Appl Bacteriol* 1990; 69: 1-16.

Cipriano R. *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. *Fish Dis. Leaflet* 68. 2001; 1-24.

Crittenden R, Saarela M, Mättö J, Ouwehand A, Salminen S, Peltö I, Vaughan E, De Vos W, Von Wright A, Fondén R, Mattila-Sandholm T. *Lactobacillus casei* subsp. *casei* F19: Survival, ecology and safety in the human intestinal tract. A survey of feeding. Studies within the probdemo project. *Microbial ecology in health and disease* 2002; 14 (1). :22-2.

Choudhury D, Pala A K, Saha N P, Kumara S, Das S S, Mukherjee S C.. Dietary yeast RNA supplementation reduces mortality by *Aeromonas hydrophila* in rohu (*Labeo rohita* L.) Juveniles. *Fish Shellfish Immunol* 2005; 19:281-291.

Dalmo R, Bøgvold J. β -glucans as conductors of immune symphonies. Review. *Fish Shellfish Immunol* 2008, 25:384-396.

Ellis A E. In: Ellis A E, editor. General principles of fish vaccination. London: *Academic Press*; 1988. 19p.

El-Boshy M, El-Ashram A, AbdelHamid F, Gadalla H A. Immunomodulatory effect of dietary *Saccharomyces cerevisiae*, β -glucan and laminaran in mercuric chloride treated Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Imm* 2010; 28:802-808.

Engstad R E, Robertsen B. Specificity of a β -glucan receptor on macrophages from Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Dev Comp Immunol* 1994; 18 (5):397-408

FAO. State of world aquaculture. Production: environments, species, quantities and values. Fishery and Aquaculture Department. Corporate Document Repository. Fisher Technical paper N°500 2006. Roma. 16 p.

Gómez, G, Balcazar, J L. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2008; 52, 145–154.

Harikrishnan R, Balasundaram C, Moon Y G, Kim M C, Kim J S, Dharaneedharan S, Heo M S .. Phytotherapy of ulcerative dermatitis induced by *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish (*Carassius auratus*). *Acta Vet Hung* 2010, 58 (1):29-37

Hernandez L H, Barrera J C, Mejía G C, Mejía M, Del Carmen M, Dosta M, De Lara Andrade R, Sotres J A M. Effects of the comercial probiotic *Lactobacillus casi* on growth, protein content of skin mucus and stress resistance of juvenils of the pothole livebearer *Poecilopsis gracilis* (Poecilidae). *Aquaculture Nutrition* 2010, 16: 407-411.

Iregui C, Hernández E, Jiménez A, Pulido A, Rey AL, Comas J, Peña LC, Rodríguez M. Primer mapa epidemiológico de las lesiones y enfermedades de los peces en Colombia. Universidad Nacional de Colombia - Ministerio de Agricultura. 2004. 100p.

Irianto A, Austin B. Probiotics in aquaculture. *J Fish Dis* 2002; 25:633–642.

Janda J M, Abbott S L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenecy and infection. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23 (1):35-73.

Jiménez A, Iregui C, Figueroa J. Caracterización y evaluación *in vivo* e *in vitro* del lipopolisacárido de *Aeromonas hydrophila*. *Acta biol. Colomb* 2008; 13 (2)147-162.

Jun J W, Kim JH, Gómez D K, Choresca C H, Han J, Shin S P, Park S C. Ocurrence of tetraciclina resistant *Aeromonas hydrophila* infection in korean cyprinid loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Afr J Microbial Res* 2010; 4(9):849-855.

Kekkoken R. Immunomodulatory effects of probiotic bacteria in healthy adults. 2008. Academic Dissertation. Institute of Biomedicine, Pharmacology. University of Helsinki. Finland. 119p.

Kumari J, Sahoo PK. Dietary immunostimulants influence specific immune response and resistance of healthy and immunocompromised Asian catfish

Clarias batrachus to *Aeromonas hydrophila* infection. *Diseases of Aquatic Organisms* 2006; 70(1-2):63-70.

Mishra V, Prasad D N. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probióticos. Short communication. *Int J Food Microbiol* 2005; 103:109– 115.

Nguyen T, Dierckens K, Sorgeloos P, Bossier P. A Review of the Functionality of Probiotics in the Larviculture Food Chain. *Mar Biotech* 2008; 10:1–12.

Nikoskelainen S, Ouwehand A, Bylund G, Salmien S, Lilius E. Immune Enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish & Shellfish Immunol* 2003; 15:443-452.

Nopadon P, Kobayashi T, Katagiri T, Maita M, Endo M. Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Vet Immunol Immunopathol* 2006; 113:339–347.

Oliveira S, Souza R T, Brasil E M, Andrade J I, Nunes E S, Ono E A, Affonso G, 2011. LD50 of the bacteria *Aeromonas hydrophila* to matrinxã, *Brycon amazonicus*. *Acta Amazonica* 41(2). 2011: 321 – 326.

Pachanawan A, Phumkhachorn P, Rattanachaikunsopon P. 2008. Potential of *Psidium guajava* supplemented fish diets in controlling *Aeromonas hydrophila* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J Biosci Bioeng*. 106 (5):419-124.

Raa, J. The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds. En: Cruz - Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R, (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V*

Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, Mexico.

Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *The American Journal of Hygiene* 1938; 27: 493–497.

Rey A. Caracterización de las enfermedades de tilapia híbrida (*Oreochromis* sp). cultivada en el departamento del Tolima. Sistematización de la información. Tesis de Maestría en producción animal. Línea de fisiopatología Veterinaria. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Bogotá. 2002.

Rey A, Verjan N, Ferguson H, Iregui C. Pathogenesis of *Aeromonas hydrophila* strain KJ99 infection and its extracellular products in two species of fish. *Vet Rec* 2009; 164(16):493-499.

Ringø E, Jutfelt F, Kanapathippillai P, Bakken Y, Sundell K, Glette J, Mayhew TM, Myklebust R, Olsen R. Damaging effect of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* on intestinal enterocytes of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Cell Tissue Res* 2004; 318: 305–311.

Rodriguez I, Chamorro R, Novoa B, Figueras A. 2009. β -glucan administration enhances disease resistance and some innate immune responses in zebrafish (*Danio rerio*) *Fish Shellfish Imm* 27:369-373.

Rombout J. H, Abelli L, Picchietti S, Scapigliati G, Kiron V. Teleost intestinal immunology. *Fish and Shellfish Immunol* 2010. (In Press, Corrected Proof).

Salinas I, Myklebust R, Esteban M, Olsen R, Meseguer J, Ringø E. In vitro studies of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) foregut: Tissue responses and evidence of protection against *Aeromonas*

salmonicida subsp. *salmonicida* epithelial damage. *Veterinary Microbiology* 2008; 128; 167–177

Schrers V, Van der Marel M, Neuhaus H, Steinhagen D. Changes of intestinal mucus glycoproteins after peroral application of *Aeromonas hydrophila* to common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* 2009; 288:184-189.

Selvaraj V, Sampath K, Sekar V. Administration of lipopolysaccharide increases specific and non-specific immune parameters and survival in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* 2009; 286: 176-183.

Selvaraj V, Sampath K, Sekar V. 2005. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol* 19(4): 293-306.

Selvaraj V, Sampath K, Sekar V. Adjuvant and Immunulatory effect of β -glucan administration in combination with LPS enhances survival and some immune parameters in carp challenge with *A. hydrophila*. *Vet Immunol Immunopathol* 2006; 114:15-24

Tizard I. *Veterinary immunology*. 8 edition. Saunders Elsevier. 2009. 600p.

Verdenelli MC, Ghelfi F, Silvi S, Orpianesi C, Cecchini C, Cresci A. Probiotic properties of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei* isolated from human faces. 2009. *Eur J Nutr*, 48 (6):355-363.

Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiol Mol Rev* 2000; 64:655–671.

Wei-Hua C, Cheng-Ping L. *In vivo* fish models for visualizing *Aeromonashydrophila* invasion pathway using GFP as a biomarker. *Aquaculture* 2008; 277: 152-155.

Whittington R, Lim C, Klesius P. Effect of dietary β -glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 2005; 248:217-225.

Yanong R. Necropsy Techniques for fish. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. 2003; 13(2): 89-105.

Zhang Y, Ong C, Leung K. Molecular analysis of genetic differences between virulent and avirulent strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from disease fish. *Microbiol* 2000; 146:999-1099.

CONCLUSION GENERAL

La inclusión de diferentes mezclas potencialmente inmunoestimulantes, que incluyen β -glucanos, LPS y la bacteria probiótica *L. casei* en la dieta de alevinos de tilapias híbridas (*Oreochromis. spp*), mostró que solo la dieta de β -glucanos mezclado con *L. casei*, proporciona una adecuada estimulación del sistema inmune innato, a través del incremento en la producción del anión superóxido, incremento en linfocitos y activación de CMM en el bazo, durante la segunda semana de suministro. Adicionalmente los alevinos de tilapia alimentados con esta dieta inmunoestimulante, mostraron un incremento en la sobrevivencia ante el desafío intraperitoneal con el patógeno oportunista *Aeromonas hydrophila*.