

TESIS

TESIS

TESIS

TESIS

TESIS



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

**CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRONÓMICAS Y VETERINARIAS**

TESIS

**EFFECTOS DE LA OLEORRESINA DE *Capsicum annum* EN EL DESEMPEÑO
Y RESISTENCIA DE *Oreochromis niloticus* CONTRA *Streptococcus iniae***

PRESENTA

David Ibarra Martínez

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

TUTOR

Dr. José Luis Arredondo Figueroa

COMITÉ TUTORAL

Dr. Teódulo Quezada Tristán

M.C. Leticia Chávez González

Aguascalientes, Ags., 30 mayo del 2017

TESIS

TESIS

TESIS

TESIS

TESIS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

OF. NO. CCA-D-11-15-122-17

Dra. en Admón. María del Carmen Martínez Serna
Directora General de Investigación y Posgrado
PRESENTE.

Por medio de la presente me permito comunicarle a usted que la tesis titulada "EFECTOS DE LA OLEORRESINA DE *CAPSICUM ANNUUM* EN EL DESEMPEÑO Y RESISTENCIA DE *OREOCHROMIS NILOTICUS* CONTRA *STREPTOCOCCUS INIAE*", del alumno **DAVID IBARRA MARTÍNEZ**, egresado de la Maestría en Ciencias Agronómicas y Veterinarias, respeta las normas y lineamientos establecidos institucionalmente para su elaboración y su autor cuenta con el voto aprobatorio de su tutor y comité tutorial.

Sin más por el momento aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Jesús María, Ags., 02 de Junio del 2017
"SE LUMEN PROFERRE"



Dr. Raúl Ortiz Martínez
Decano del Centro

c.c.p. Jefa del Departamento de Control Escolar
c.c.p. Sección de Certificados y Títulos
c.c.p. Secretario Técnico
c.c.p. Estudiante
c.c.p. Archivo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

DR. RAÚL ORTIZ MARTÍNEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
PRESENTE

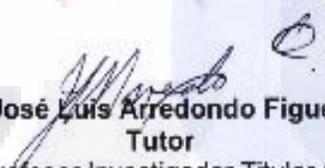
Por este conducto tengo a bien informarle que **DAVID IBARRA MARTÍNEZ** estudiante de la Maestría en Ciencias Agronómicas y Veterinarias ha cumplido de manera satisfactoria el proceso de redacción, revisión y correcciones de su tesis titulada: **'Efectos de la oleorresina de *Capsicum annuum* en el desempeño y resistencia de *Oreochromis niloticus* contra *Streptococcus iniae*'**.

Por lo anterior no tengo inconveniente en otorgar mi **VOTO APROBATORIO** para la impresión del documento y continuar con el proceso de titulación y programación del examen de grado.

Atentamente

"Se lumen proferre"

Aguascalientes, Ags. a 16 de mayo de 2017


Dr. José Luis Arredondo Figueroa

Tutor

Profesor Investigador Titular C

Miembro del SNI nivel 2



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

DR. RAÚL ORTIZ MARTÍNEZ

DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTE

Por este conducto tengo a bien informarle que **DAVID IBARRA MARTÍNEZ** estudiante de la Maestría en Ciencias Agronómicas y Veterinarias ha cumplido de manera satisfactoria el proceso de redacción, revisión y correcciones de su tesis titulada "Efectos de la oleorresina de *Capsicum annuum* en el desempeño y resistencia de *Oreochromis niloticus* contra *Streptococcus iniae*".

Por lo anterior no tengo inconveniente en otorgar mi **VOTO APROBATORIO** para la impresión del documento y continuar con el proceso de titulación y programación del examen de grado.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags. a 15 de mayo de 2017

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Teódulo Quezada Tristán'.

Dr. Teódulo Quezada Tristán

Integrante de Comité Tutorial



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

DR. RAÚL ORTIZ MARTÍNEZ

DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTE

Por este conducto tengo a bien informarle que **DAVID IBARRA MARTÍNEZ** estudiante de la Maestría en Ciencias Agronómicas y Veterinarias ha cumplido de manera satisfactoria el proceso de redacción, revisión y correcciones de su tesis titulada "**Efectos de la oleorresina de *Capsicum annuum* en el desempeño y resistencia de *Oreochromis niloticus* contra *Streptococcus iniae***".

Por lo anterior no tengo inconveniente en otorgar mi **VOTO APROBATORIO** para la impresión del documento y continuar con el proceso de titulación y programación del examen de grado.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags. A 17 de mayo de 2017

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Leticia Chávez González'.

M.C. Leticia Chávez González

Integrante de Comité Tutorial

RECONOCIMIENTOS

Este protocolo de tesis de maestría se desarrolló gracias a la participación del Dr. José Luis Arredondo Figueroa y el Comité Tutorial.

Se reconoce el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (registro de becario no. 666132).

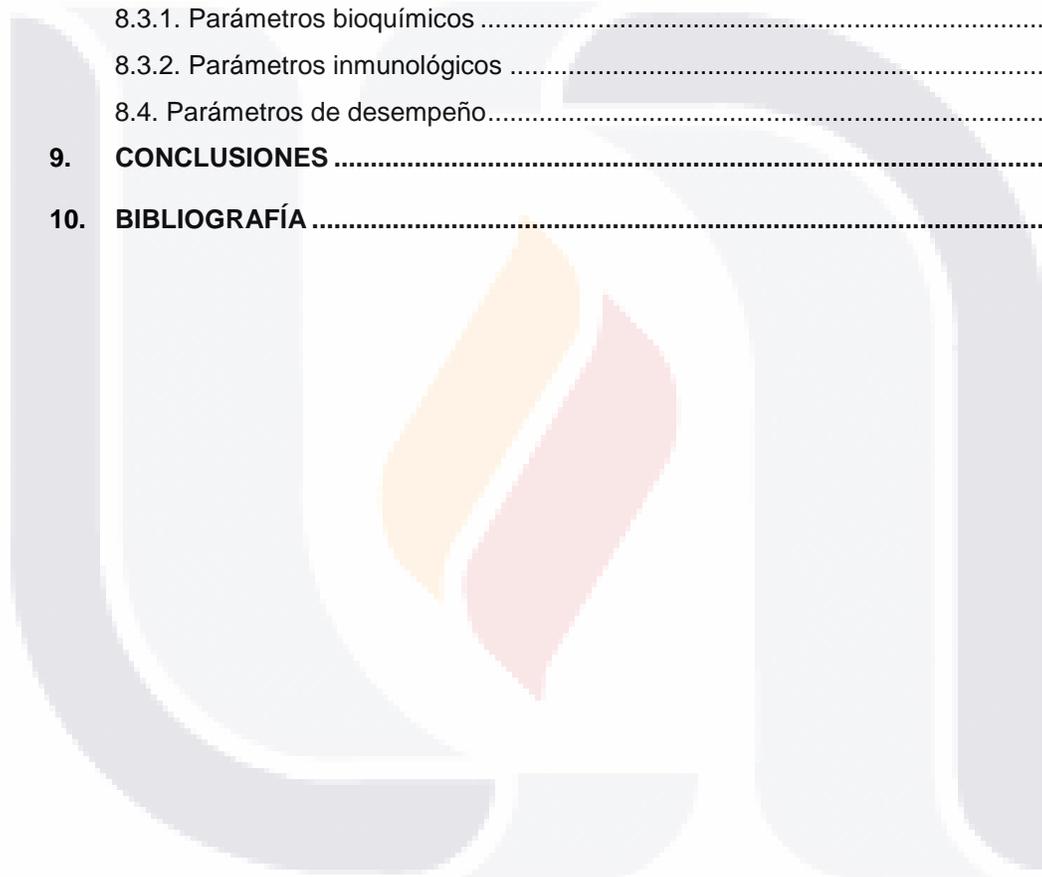


ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	1
ÍNDICE DE TABLAS	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ACRÓNIMOS.....	7
RESUMEN	11
ABSTRACT	13
1. INTRODUCCIÓN	15
2. ANTECEDENTES.....	17
2.1 Situación actual del cultivo de la Tilapia.	17
2.2. Biología de la especie.....	18
2.3. Fisiología de los peces	19
2.4. Streptococcus spp.	20
2.4.1. Estreptococosis en peces.....	25
2.4.2. Distribución mundial y especies susceptibles.	29
2.4.3. Epizootiología.....	30
2.4.4. Virulencia.....	32
2.4.5. Signos y manifestaciones patológicas.....	36
2.4.6. Tratamientos.....	38
2.4.7. Vacunación.....	39
2.4.8. Medidas preventivas.....	40
2.5 Fitobióticos.	41
2.5.1.Fitobióticos en la acuicultura	41
2.5.2. Inmunoestimulantes.	41
2.5.3. Promotores del crecimiento.	42
2.6. Carotenoides.....	42
2.6.1. Características.....	42
2.6.2. Uso de los carotenoides en la acuicultura.....	43
3. HIPÓTESIS	46
4. OBJETIVOS.....	47

4.1. Objetivo general.....	47
4.2. Objetivos específicos.....	47
5. JUSTIFICACIÓN.....	48
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
6.1. Diseño Metodológico.....	49
6.2. Población bajo estudio.....	50
6.2.1. Características generales.....	50
6.2.2. Ubicación del experimento.....	50
6.2.3. Los peces.....	51
6.2.4. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.....	51
6.3. Cepa <i>Streptococcus iniae</i>	52
6.4. Calidad del agua.....	52
6.5. Oleorresina de <i>Capsicum annum</i>	53
6.6. Dietas experimentales.....	53
6.7. Técnicas para la obtención de la información sustantiva.....	54
6.7.1. Hematocrito.....	54
6.7.2. Recuentos totales de glóbulos rojos y blancos.....	54
6.7.3. Hemoglobina.....	55
6.7.4. Proteínas plasmáticas.....	56
6.7.5. Albúmina.....	56
6.7.6. Globulinas.....	56
6.7.7. IgM.....	56
6.7.8. Crecimiento.....	57
6.7.9. GP.....	58
6.7.10. FCA.....	58
6.7.11. TEC.....	58
6.8. Modelo estadístico.....	58
6.8.1. Pruebas estadísticas.....	59
7. RESULTADOS.....	60
7.1. Curso de la infección.....	60
7.2. Hematología.....	60
7.2.1. Serie roja.....	60
7.2.2. Serie blanca.....	61
7.3. Química sanguínea.....	62

7.4. Parámetros inmunológicos.....	64
7.5. Parámetros de desempeño productivo.....	67
8. DISCUSIÓN	70
8.1. Curso de la infección.....	70
8.2. Hematología.....	71
8.2.1. Serie roja.....	71
8.2.2. Serie blanca	72
8.3. Química sanguínea e inmunología	72
8.3.1. Parámetros bioquímicos	72
8.3.2. Parámetros inmunológicos	74
8.4. Parámetros de desempeño.....	75
9. CONCLUSIONES	76
10. BIBLIOGRAFÍA	77



ÍNDICE DE TABLAS

No.	Contenido	Página
1	Identificación de <i>Streptococcus</i> según pruebas bioquímicas	22
2	Características de los <i>Streptococcus</i> y <i>Enterococcus</i> más frecuentemente aislados en peces	26
3	Diseño factorial	49



ÍNDICE DE FIGURAS

No.	Contenido	Página
1	<i>Oreochromis niloticus</i> , mapamundi con los principales países productores de tilapia y unidad de producción de tipo intensivo.	17
2	Tinción Gram, mostrando cadenas largas de <i>S. iniae</i> .	21
3	Factores de virulencia de <i>Streptococcus spp.</i>	33
4	Exoftalmia bilateral en juvenil de <i>O. niloticus</i> causada por <i>Streptococcus spp.</i> en una unidad productiva de Aguascalientes, México.	37
5	Proceso de vacunación de juveniles de tilapia	39
6	Numeración y clave con letras griegas de acuerdo a las estructuras posibles de los extremos del caroteno	43
7	Ubicación geográfica del estudio	50
8	Sistema cerrado de recirculación, donde se llevó acabo el experimento	51
9	Crecimiento y β -hemólisis de <i>S. iniae</i> a las 48 h de incubación a 37°C en agar sangre.	52
10	Equipo para evaluación de los parámetros fisicoquímicos de la calidad de agua, muestra para determinación de la dureza total, muestra de amonio y el blanco correspondiente	53
11	Aplicación por aspersión de la ORC en el alimento	54
12	Instrumentos para medición de microhematocrito	54
13	Pipeta para eritrocitos con sangre y solución Natt Herricks para el conteo de glóbulos rojos y blancos.	55
14	Equipo RA-50 utilizado para evaluar la química sanguínea	56
15	Instrumentos utilizados para medición de IgM.	57
16	Medición de longitud total (LT) en ictiometro y obtención del peso total (PT)	57

	cada individuo por tratamiento	
17	Placa de agar sangre con isopado de corazón de tilapia del tratamiento tres sin crecimiento bacteriano a las 48 h de incubación a 37 ° C y tilapia del tratamiento tres sin signos de estreptococosis	60
18	Valores promedio de hematocrito por tratamiento.	61
19	Conteo de leucocitos por tratamiento.	61
20	Concentración promedio de proteínas totales por tratamiento.	62
21	Concentración promedio de albúmina por tratamiento.	63
22	Concentración promedio de la relación albúmina/globulina por tratamiento..	63
23	Concentración promedio de IgM por tratamiento	64
24	Respuesta inmune mediada por la IgM y glóbulos blancos (GB) del tratamiento uno.	64
25	Respuesta inmune mediada por IgM y glóbulos blancos (GB) del tratamiento dos.	65
26	Respuesta inmune mediada por IgM y glóbulos blancos (GB) del tratamiento tres.	65
27	Respuesta inmune mediada por IgM y glóbulos blancos (GB) del tratamiento cuatro.	66
28	Respuesta inmune mediada por IgM y glóbulos blancos (GB) del tratamiento cinco.	66
29	Respuesta inmune mediada por IgM y glóbulos blancos (GB) del tratamiento seis.	67
30	Valor promedio de la Ganancia dePeso (GP) de cada tratamiento.	68
31	Valor promedio de FCA de cada tratamiento.	68
32	Valor promedio de TEC de cada tratamiento.	69

ÁCRONIMOS

Sigla o abreviatura	Significado
%	Porcentaje
%/día	Porcentaje por día
±	Signo matemático más-menos
≈	Signo matemático casi igual
°C	Grados Centígrados
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
A.C.	Antes de Cristo
AE	Aceite Esencial
ANDEVA	Análisis de la Varianza
ATCC	American Type Culture Collection
CCA	Centro de Ciencias Agropecuarias
cel./µL	Células por microlitro
CIAD	Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo
Cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
CPS	Cápsula de Polisacáridos
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Dpi	Días post infección
ECP	Productos Extra Celulares
EDTA	Ácido Etilendiamino Tetra Acético
FAO	Organización de las Naciones Unidas

para la Alimentación y la Agricultura

FCA	Factor de Conversión Alimenticia
g	Gramo
g/dL	Gramo por decilitro
GAS	<i>Streptococcus</i> del grupo A
GBS	<i>Streptococcus</i> del grupo B
GCSD	<i>Streptococcus</i> del grupo C (<i>disgallactiae</i>)
GLM	Modelo Linear General
GP	Ganancia de Peso
h	Horas
IgM	Inmunoglobulina M
IL-8	Interleucina 8
IM	Intra Muscular
IP	Intra Peritoneo
KDa	Kilo Dalton
Kg	Kilogramo
L	Litro
LD₅₀	Dosis letal media
Ln	Logaritmo natural
Log	Logaritmo
LT	Longitud Total
mg/Dl	Miligramos por decilitro
mg/L	Miligramo por litro
Min	Minuto
mL	mililitro

mL/kg	Mililitro por kilogramo
Mm	Milímetro
NaCl	Cloruro de sodio
NH₃	Amonio
Nm	Nanómetro
NO₂-N	Nitrito
NO₃-N	Nitrato
O.D.	Oxígeno Disuelto
ORC	Oleo Resina de <i>Capsicum</i>
P<0.05	Diferencia estadística significativa
pH	potencial de Hidrógeno
PT	Peso Total
r RNA	Ácido Ribonucleico ribosomal
Rpm	Revoluciones por minuto
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SCR	Sistema Cerrado de Recirculación
SLO	Estreptolisina O
SLS	Estreptolisina S
TEC	Tasa Específica de Crecimiento
UAA	Universidad Autónoma de Aguascalientes
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colonias por mililitro
UI/kg	Unidades Internacionales por kilogramo
UV-VIS	Luz Ultra Violeta-Visible

γ	Gama
α	Alfa
α -TNF	Factor de Necrosis Tumoral alfa
β	Beta



RESUMEN

La acuicultura mundial ha crecido exponencialmente en los últimos años. La Tilapia (*Oreochromis spp.*) es una de las especies de mayor explotación. *Streptococcus iniae* es una amenaza para la sustentabilidad de la acuicultura. La utilización de fitobióticos como la oleorresina de *Capsicum annuum* (ORC), ofrecen una alternativa sustentable para mejorar el rendimiento de los peces y sustituir a los antibióticos. El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de la dieta con ORC sobre la resistencia de la tilapia del Nilo (*O. niloticus*) contra *S. iniae*. Se describió el curso de la infección en juveniles de tilapia inoculadas con la cepa ATCC 29178 de *S. iniae*. Se realizó un diseño experimental con un arreglo factorial de 2x3 con medidas repetidas (MR), con dos dosis de infección: 0 y 400 μ L, tres dosis de oleorresina 0,1 y 2 mL/kg de alimento y tres tiempos de evaluación 2, 15 y 30 días post inoculación (dpi). Se utilizaron 120 tilapias (20 peces por tratamiento) con peso promedio 49.9 (\pm 20 g) durante 30 días de experimento, con tamaño de muestra $n=3$ por cada tratamiento. Los peces se colocaron en estanques de plástico de 650 L, con un sistema cerrado de recirculación (SCR). Los peces fueron alimentados con un extruido 1.5 mm y 44 % de proteína a razón del 4% del peso vivo dos veces por día. Se realizaron análisis microbiológicos, se determinó la ganancia de peso, la tasa específica de crecimiento (TEC) y el factor de conversión alimenticia (FCA) y se evaluó el estado fisiológico de las tilapias en cada tratamiento, mediante la medición de los perfiles hematológicos, bioquímicos e inmunológicos. Los valores de glóbulos rojos y hemoglobina no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos. Los glóbulos blancos presentaron un incremento significativo en todos los tratamientos a los dos dpi ($P < 0.05$). Las proteínas plasmáticas registraron niveles más bajos en los tratamientos con 2 mL de ORC ($P < 0.05$). La albúmina presenta diferencias significativas ($P < 0.05$) en los tratamientos con 2 mL de ORC con valores por debajo del control. La IgM mostró niveles más altos en los tratamientos con 1 y 2 mL de ORC respecto al control ($P < 0.05$). Los peces del tratamiento sin inocular y 2 mL de ORC obtuvieron un valor de 1.18 de FCA y una mayor ganancia de peso. Se demostró que, la utilización de 2 mL de ORC/kg de alimento logró aumentar los valores de IgM, mejoró la conversión alimenticia y aumentó la ganancia de peso.

Palabras claves: *Estado fisiológico; Oleorresina no saponificada; Capsicum annum; Oreochromis niloticus; Streptococcus iniae; Acuicultura; Aguascalientes.*



ABSTRACT

Global aquaculture has grown exponentially in recent years. Tilapia (*Oreochromis spp.*) is one of the most cultivated species. *Streptococcus iniae* is a threat to the sustainability of aquaculture. The use of phytobiotics such as *Capsicum annum* oleoresin (ORC), offer a sustainable alternative to improve the performance of fish and to replace antibiotics. The aim of this work was to evaluate the effects of the diet with ORC on the resistance of Nile tilapia (*O. niloticus*) against *S. iniae*. The course of infection in subadult of tilapia inoculated with strain ATCC 29178 *S. iniae* was described. The experimental was performed with a 2x3 factorial arrangement with repeated measurements (RM), with two doses of infection: 0 and 400 μ L, three doses of oleoresin 0, 1 and 2 mL/kg of food and three evaluation times 2, 15 and 30 days post inoculation (dpi). 120 tilapia (20 fish per treatment) were used with average weight 49.9 (\pm 20 g) for 30 days of experiment, with sample size $n = 3$ for each treatment. The fish were placed in plastic containers of 650 L, with a closed recirculation system (CRS). The fish were fed a 1.5 mm extrudate and 44% protein at 4% of live weight twice daily. Microbiological tests were performed, weight gain, specific growth rate (SGR) and feed conversion (FC) were determined and the physiological state of the tilapia was evaluated in each treatment by measuring the hematological, Biochemical and immunological profiles. Red blood cells counts and hemoglobin concentration did not present significant differences between the treatments. White blood cells counts showed a significant increase in all treatments at two dpi ($P < 0.05$). Plasmatic proteins showed lower levels in the treatments with 2 mL of ORC ($P < 0.05$). Albumin presented significant differences ($P < 0.05$) in the treatments with 2 mL of ORC with values below the control. IgM showed higher levels in treatments with 1 and 2 mL of ORC than control ($P < 0.05$). Fish from the treatment: without inoculum and 2 mL ORC obtained a value of 1.18 FC and a greater weight gain. It was shown that using 2 ml of ORC/kg of food was able to increase IgM values, improved feed conversion and increased weight gain. Results obtained in the present study indicated that implementation of 2 mL of ORC/kg of food was able to increase IgM values, improved feed conversion and increased weight gain.

Key words: Physiological state; Unsaponified oleoresin; *Capsicum annum*; *Oreochromis niloticus*; *Streptococcus iniae*; Aquaculture; Aguascalientes.



1. INTRODUCCIÓN

Según estadísticas de la FAO (2012), la acuicultura es el sector productivo de alimentos de origen animal de más rápido crecimiento, con un incremento medio anual del 6% en el periodo de 1990 a 2010 (Reverter y col., 2014). Desde 1990, la pesquería de peces se ha mantenido estable en alrededor de 90 millones de toneladas, mientras que, la acuicultura se ha revelado como la fuente principal para aumentar el suministro de pescado. En los últimos 30 años, la acuicultura es el sector de mayor crecimiento a nivel mundial (Acar y col., 2015). Los pescados y los mariscos representan una fuente valiosa de proteínas y micronutrientes esenciales para mantener una nutrición equilibrada y una buena salud. En la actualidad, se cultivan cerca de 200 especies de peces teleósteos y de mariscos al rededor del mundo, y su producción es más del doble que las pasadas dos décadas (Morrison y Nowak, 2002). En 2009, el pescado representó el 17 % de la ingesta de la población mundial de proteína animal y el 6.5 % de toda la proteína animal consumida. La producción acuícola mundial alcanzó 62 millones de toneladas en 2011 (con exclusión de las algas marinas y los productos no alimentarios), con un valor estimado de \$ 130 mil millones de dólares. El principal objetivo de la acuicultura es mantener a los peces saludables para obtener un mejor rendimiento (Acar y col., 2015).

A medida que la industria de la acuicultura se ha intensificado y diversificado, es natural que la domesticación de nuevas especies resulte en el reconocimiento de los "nuevos" agentes infecciosos y las enfermedades. La mortalidad debido a las enfermedades infecciosas representa la mayor pérdida económica en la industria acuícola (Guimarães y col., 2014). Esto se ha demostrado en varias ocasiones en los últimos años (Colquhoun y Duodu, 2011), tal es el caso de *Streptococcus iniae*, que es una de las principales amenazas para la producción de tilapia (Acar y col., 2015), por su papel como enfermedad emergente, responsable de grandes pérdidas económicas en la acuicultura de peces de aguas cálidas en todo el mundo (Baums y col., 2013). El fuerte vínculo entre el estrés y la susceptibilidad a enfermedades en peces de cultivo ha sido reconocido desde tiempo atrás (Cnaani y col., 2004).

La sustentabilidad de la acuicultura depende del balance entre la salud y el crecimiento de los peces. El uso de quimioterapéuticos y de antibióticos para el combate de las enfermedades tiene el riesgo de generar la resistencia de los patógenos, la bio-acumulación y la contaminación ambiental. Las vacunas comerciales son costosas y específicas contra un patógeno en particular (Cristea y col., 2012). Los antibióticos se utilizan comúnmente para controlar las enfermedades de los peces, mejorar su sistema inmunológico y como un promotor del crecimiento. Sin embargo, el uso de antibióticos se ha restringido en muchos países debido a la resistencia inducida a las bacterias. Los productos químicos sintéticos, como el peróxido de hidrógeno, la formalina y el sulfametoxazol pueden tener efectos negativos sobre los peces (Acar y col., 2015).

En cambio, el empleo de aceites esenciales de plantas parecen no afectar el estado de salud de los peces (Acar y col., 2015). Estudios recientes sobre los aceites esenciales (AE) de plantas o frutas, han demostrado que sus componentes principales poseen un amplio espectro de actividad biológica en campos como la química de los alimentos, la farmacología y la farmacéutica (Acar y col., 2015). Por lo tanto, los investigadores se están centrando en las alternativas para sustituir el uso de antibióticos en la acuicultura. Las plantas con propiedades medicinales, las especias y sus productos han sido exitosos como reemplazo de los antibióticos en el cultivo de la tilapia (Acar y col., 2015).

2. ANTECEDENTES

2.1. Situación actual del cultivo de la Tilapia.

La Tilapia (*Oreochromis spp.*) está considerada el pez de mayor producción en el mundo para la alimentación humana a través de la acuicultura. El cultivo esta especie implica normalmente una alta densidad de la población en jaulas flotantes, en canales y en estanques de tierra (Mian y col., 2009). Es conocida como “gallina del agua” debido a su rápido crecimiento y a la alta sobrevivencia en aguas de pobre calidad (Abdullah y col., 2013) (**Figura 1**). Tiene una carne blanca, su alimentación es versátil y es fácil de cultivar. Se considera que la tilapia, es relativamente resistente a enfermedades bacterianas, fúngicas, parasíticas y virales (Abdullah y col., 2013). No obstante, las enfermedades amenazan la producción de la tilapia, debido a las prácticas de cultivo intensivo, a las condiciones ambientales desfavorables como la temperatura, el nivel de oxígeno disuelto, el amoníaco no ionizado y los insecticidas. Las malas prácticas de manejo como la nutrición inadecuada y las elevadas densidades, pueden estresar a la tilapia causando inmuno-supresión y un aumento en la susceptibilidad a las infecciones estreptocócicas (Wu y col., 2013).



Figura 1. Izquierda: *Oreochromis niloticus*. Derecha arriba: mapamundi con los principales países productores de tilapia en color naranja (Fuente: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/es). Derecha abajo: unidad de producción de tipo intensivo (Fuente: elaboración propia).

Algunas de las especies de tilapia, han sido cultivadas en estanques desde el año 1,000 A.C. No obstante, no es sino hasta el presente siglo que se inicia su explotación intensiva a una escala mundial. Los primeros resultados del cultivo de esta especie obtenidos en Malasia, causaron grandes expectativas en relación con su potencial productivo y ello contribuyó a que de 1950 a 1970 la tilapia fuera distribuida al resto del mundo tanto en zonas tropicales como subtropicales. El cultivo de tilapia en México inicia en 1964 y para 1993 la producción nacional de la tilapia representó la quinta parte de la producción mundial (Arredondo y Lozano, 2003). Actualmente, México ocupa el noveno lugar mundial en producción de tilapia con 128,866 toneladas anuales (SAGARPA, 2016).

2.2. Biología de la especie.

La tilapia pertenece al grupo de los peces Cíclidos de la tribu *Tilapiini*, que son originarios de África Oriental. Son organismos euritérmicos, que resisten una amplia gama de temperatura del agua, con un intervalo de tolerancia desde los 12 a los 42°C. Se les considera especies eurihalinas, ya que pueden vivir en aguas continentales, salobres y marinas, con un intervalo de tolerancia que va desde agua de baja salinidad hasta 40%. Su fecundación es externa y el número de huevos producidos por hembra varía según la especie, la talla y el peso de los reproductores. El fotoperiodo, la temperatura (por arriba de los 24°C) y la presencia del sexo opuesto, son factores que influyen sobre la madurez sexual. Los organismos alcanzan la madurez sexual a una edad temprana, a partir de los dos ó tres meses y a una longitud de 8 a 16 cm. La frecuencia de desove varía considerablemente dependiendo de los factores climáticos, pudiendo ser desde seis a 16 veces al año. La tilapia se caracteriza por hacer nidos y cuidado a sus crías (Arredondo y Lozano, 2003).

2.3. Fisiología de los peces.

En la acuicultura intensiva, los peces son expuestos a numerosos factores de estrés durante el ciclo productivo, que directa o indirectamente afectan la respuesta inmune y la resistencia hacia las infecciones por microorganismos presentes en el medio, además del efecto negativo sobre el crecimiento y la reproducción (Cnaani y col., 2004).

Las respuestas fisiológicas al estrés se clasifican como primarias, secundarias y terciarias. Muchas de estas respuestas se utilizan como indicadores cuantitativos de estrés en los peces. La respuesta primaria a la tensión está indicada por la rápida elevación de las catecolaminas plasmáticas y los corticosteroides. La variedad de respuestas fisiológicas secundarias, puede incluir cambios metabólicos, hematológicos, inmunológicos. La respuesta terciaria hace referencia a la afectación sobre el crecimiento, la tasa metabólica, la resistencia a enfermedades, la tolerancia térmica, la hipoxia y la capacidad reproductiva (Cnaani y col., 2004).

En términos generales, las diferencias entre organismos sanos y organismos enfermos en sus valores bioquímicos y sanguíneos, pueden ser interpretados como un incremento de la respuesta inmune no específica (Acar y col., 2015). Por ejemplo, el aumento de la concentración de la glucosa es una respuesta secundaria al estrés, por lo que la concentración de glucosa se utiliza en una amplia variedad de especies de peces, como un indicador del estado fisiológico del organismo (Cnaani y col., 2004), al igual que los cambios en los valores de: conteo de células rojas, hematocrito, hemoglobina (Acar y col., 2015). Otro indicador importante es la medición de proteínas séricas, ya que la albúmina y la globulina son las proteínas de mayor importancia en el plasma de los peces y son utilizadas para la evaluación de respuesta inmune inespecífica. (Acar y col., 2015).

Filogenéticamente, los peces son el grupo más primitivos de los vertebrados que poseen un sistema inmune adaptativo y generan una respuesta de anticuerpos efectiva ante los desafíos patogénicos (Morrison y Nowak, 2002). El sistema inmune de los peces es similar al de los vertebrados superiores, ambos tienen dos componentes. El primer componente es el innato, o defensa no específica formada por una serie de compuestos celulares, y el segundo es el adquirido o específico,

caracterizado por la respuesta humoral a través de la producción de anticuerpos mediada por linfocitos T. La primera línea de defensa contra la invasión de patógenos está mediada por el sistema innato, formado por macrófagos, monocitos, granulocitos y elementos humorales como el complemento y la lisozima (Cristea y col., 2012). La detección de los niveles de anticuerpos específicos ha sido utilizado como una herramienta para la detección de la salud de los peces (Morrison y Nowak, 2002). En los peces, la IgM es la clase de anticuerpo más importante (Girón-Pérez y col., 2009). Un claro ejemplo es la inmunidad contra *S. iniae* que ha demostrado ser mediada por anticuerpos específicos producidos por el hospedero (LaFrentz y col., 2011).

2.4. *Streptococcus* spp.

Este grupo de microorganismos denominados *Streptococcus* del griego *streptos*, sinuoso, torcido, fue descrito desde mediados de siglo XIX por investigadores como Pasteur, Rivolta y Ogston, a partir de infecciones en humanos (erisipela y abscesos) y en animales (papera equina). Los estudios fueron continuados en 1884 por Rosenbach, quien aisló un coco a partir de una colecta de un absceso humano, al que le dio el nombre de *Streptococcus pyogenes*, estableciendo el género *Streptococcus* (Songer y Post, 2005).

El género está integrado por un grupo grande de microorganismos. *Streptococcus* spp. es una bacteria esférica u ovoide, con un diámetro entre 0.5-2.0 μm ; puede estar agrupado en pares o en cadenas, crece en un medio líquido, no presenta movimiento, no forma esporas, y algunas especies pueden presentar cápsula, además, es anaerobia facultativa y requieren para su crecimiento medios ricos en nutrientes, siendo necesario en algunos casos incubarlos en una atmósfera enriquecidas con CO_2 ; es una bacteria gram-positiva, son quimiorganótrofos y presentan un metabolismo fermentativo sobre los hidratos de carbono con producción de ácido, pero no de gas (**Figura 2**). Son catalasa negativos y muchas especies son hemolíticas. Los *Streptococcus* son parásitos de los vertebrados y habitantes de la boca y tracto respiratorio. Algunas especies son patógenas para el hombre y los animales, causa una infección sistémica conocida como

streptococcosis. Taxonómicamente integran la familia *Streptococcaceae* junto con el género *Lactococcus* (Stanchi y Martino, 2007; Amal y Zamri-Saad, 2011; Acar y col., 2015).



Figura 2. Tinción Gram, mostrando cadenas largas de *S. iniae*.(Fuente: elaboración propia)

En 1887, Nocard y Mollereau aislaron un estreptococo de una vaca y reprodujeron la mastitis experimental en esta especie y en una cabra. En 1937, Sherman propusieron un esquema de clasificación donde se ubica a los *Streptococcus* en cuatro categorías organizadas de acuerdo con la producción de hemólisis, el antígeno polisacárido específico del grupo y las pruebas fenotípicas: a) fermentación de azúcares y b) tolerancia a pH 9.5 Y 6.5 % de NaCl y temperaturas de 10 y 45°C (**Tabla 1**). Los dividió en grupos denominados piogénicos (incluye a *Streptococcus* β hemolíticos), *viridans*, *láctico* y *enterococos* (Songer y Post, 2005).

Tabla 1. Identificación de *Streptococcus* según pruebas bioquímicas.

Especie de <i>Streptococcus</i>	Grupo	Hemólisis	Fermentación de			Otras pruebas
			NaCl 6.5%	Sorbitol	Trehalosa	
<i>S. agalactiae</i>	B	α β γ	-	-	+	inulina neg, CAMP pos, esculina neg, hidrólisis de hippurato
<i>S. canis</i>	G	β	-	-	+	
<i>S. didelphis</i>	G	β	-	+	+	Catalasa pos
<i>S. dysgalactiae</i>	C	α	-	-	+	inulina neg, CAMP pos, esculina neg, hidrólisis de hippurato
<i>S. equi</i>	C	B	-	+	+	
<i>S. iniae</i>	Ninguno e	B	Var	-	+	esculina pos, manitol pos, CAMP pos, hidrólisis de almidón, Vogues-Proskauer neg
<i>S. ovis</i>		α	Neg	Pos	Neg	esculina pos, Vogues-Proskauer neg, hippurato no hidrólisis
<i>S. phocae</i>	C?	B	-	-	-	Salicina neg
<i>S.</i>		α	Var	(Neg)	Pos	esculina pos, Vogues-

<i>pluranimalium</i>						Proskauer neg, hippurato hidrolizado
<i>S. procinus</i>	E,P,U,V	B	+	+	+	Mannitol pos, Vogues-Proskauer pos,CAMP pos, bilis esculina neg
<i>S.pneumoniae</i>	None	α	-	-	+	Optochin sensitive
<i>S.pyogenes</i>	A	B	-	-	+	Hippurato no hidrolizado
<i>S.sius</i>	D,R,S,T	α	-	-	+	Vogues-Proskauer neg, hidrólisis de almidón; serotipificación capsular
<i>S.uberis</i>	None	α y'	-	+	+	Inulina pos, CAMP v, esculina pos, hippurato hidrolizado

(-), Negativo; (+), Positivo; Var, Variable

Fuente: (Songer y Post, 2005)

Hasta el primer tercio del siglo XX, los *Streptococcus* eran diferenciados únicamente basados en la hemólisis, fermentación de azúcares y su tolerancia a varios químicos. (Songer y Post, 2005). En 1984, Schleifer y Klipper-Bälz, presentaron los resultados de los estudios genómicos (hibridaciones de DNA-rRNA 23s y DNA-DNA), y confirmaron que los *Streptococcus* del grupo D, del grupo enterococos, pertenecían a un género diferente, y transfirieron a estos microorganismos al género *Enterococcus* (Songer y Post, 2005).

En 1993, Lancefield introdujo un sistema serológico para la clasificación de los *Streptococcus* β hemolíticos que permitió la comprensión de la epidemiología de las enfermedades producidas por estos organismos. Este sistema consiste en dividir a los *Streptococcus* en grupos, y utilizó una reacción de precipitación y un hidrato de carbono específico de pared celular denominado antígeno C. la clasificación consistió en la designación de los serotipos específicos que van desde la letra A hasta la H y de la K a la V. En la actualidad se utilizan estas pruebas, que son útiles solo para los *Streptococcus* hemolíticos, ya que los *Streptococcus* no hemolíticos son serológicamente diferentes (Songer y Post, 2005).

2.4.1. Estreptococosis en peces.

Los reportes sobre *Streptococcus spp.* en infecciones en peces datan de mediados de 1950. Fue reportada por primera vez en 1957 en cultivos de trucha arcoíris en Japón (Abdelsalam, Asheg, y Eissa, 2013). El primer caso que involucra a la tilapia fue reportado por Wu en 1970. Desde entonces, la estreptococosis en peces es un problema de primer orden, tanto en cultivos como en especies silvestres (Roque y col., 2009). Hubert (1989) afirmó que, esta enfermedad (*Streptococcus spp.*) representa un peligro real para los acuicultores de peces en climas tropicales y parece ser la más severa amenaza para los cultivos intensivos de tilapia, ya que es una enfermedad infecciosa grave (Songer y Post, 2005). Se estima que las pérdidas económicas en el mundo por *Streptococcus spp.* están cerca de los \$ 150 millones de dólares anuales (Abdullah y col., 2013).

Austin y Austin (1987) enlistaron siete especies de *Streptococcus*: *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. equi*, *S. equisimilis*, *S. faecium*, *S. pyogenes*, y *S. zoopidemicus*, que en varias ocasiones han sido patogénicas para los peces (**Tabla 2**). Los estudios moleculares, colocaron a los miembros del género *Enterococcus* en este grupo (Plumb, 1999). Roque y col. (2009), incluyeron a *Lactococcus garvieae*, *L. piscium*, *Streptococcus iniae*, *S. parauberis* y *Vagococcus salmoninarum* como patógenos potenciales para los peces; mientras que Abdelsalam y col. (2013) adicionan en este grupo a *S. difficilis*, *Listonella psicium* y *Carnobacterium piscícola*.

Tabla 2. Características de los *Streptococcus* y *Enterococcus* más frecuentemente aislados en peces

Prueba/Característica	<i>S.iniae</i>	<i>S. faecalis</i>	<i>S. faecium</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>Grup B</i>	<i>E. seriolicid</i>
Morfología celular	Cadenas largas de envoltura esférica	Pares ovoides o cadenas cortas	Pares esféricos o cadenas cortas	?	Cadenas cortas esféricas	Cadenas cortas ovoides
Motilidad	-	-	-	-	-	-
Crecimiento a						
10° C	+	+	+	?	+	+
45 ° C	-	+	+	-	-	+
Crecimiento en						
6.5 % NaCl	-	+	+	-	-	+
0.4 % telurito	?	?	?	?	?	-
p H 9.6	-	+	+	-	-	+
Tetrazolium	?	?	±	?	?	+
0.1 % azul de metileno	?	?	?	?	-	+
40 % bilis esculina	-	+	+	+	-	+
Arabinosa	-	?	+	?	-	-
Salicina	+	?	?	?	?	±
Trehalosa	+	?	?	?	-	+
Catalasa	-	-	-	-	-	-
Almidón	+	-	-	-	-	+
Hidrolisis de Esculina	+	-	+	-	-	+
Hemólisis	Aβ	Aβ	?	-	-	Y

H₂S	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis de Arginina	?	+	+	+	±	+
Hidrólisis de Hippurato	-	+	?	+	+	-
Voges-Proskauer	-	?	?	+	+	+
Produccción de ácido a partir de						
D-xylosa	?	?	?	?	?	-
L- Rhamnosa	?	?	?	?	?	-
Sucrosa	?	?	?	?	±	-
Lactosa	-	?	?	?	-	-
Meliobosa	?	?	+	?	?	-
Raffinosa	-	?	?	-	-	-
Glycerol	?	?	?	?	?	-
Adonitol	?	?	?	?	?	-
Sorbitol	-	?	-	-	-	+
Glucosa	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	?	-	?	?	+
Grupo Lancefield	Ninguno	D	D	B	B	No D
Mol % G+ C DNA	32.9	33.5-38	38.3-39	34	?	44

Fuente: (Plumb, 1999).

La infección puede ser subaguda, pero con frecuencia, se manifiesta como una condición crónica e implica (la mayoría de los casos) organismos del grupo B de Lancefield (*S. agalactiae*) o *S. iniae*, que no expresan antígenos de Lancefield (Abdelsalam y col., 2013). Al igual que *S. iniae*, *Streptococcus agalactiae* (también conocido como *Streptococco* del Grupo B; GBS) es un agente responsable de mortalidades masivas. Estreptocosis asociadas con GBS han emergido en varios países, especialmente en la región tropical del planeta (Kayansamruaj, Pirarat, Hirono, y Rodkhum, 2014), y es considerado como uno de los patógeno emergente en el cultivo de tilapia (Abuseliana y col., 2011).

En particular, *S. iniae* también es una zoonosis, causante de celulitis localizada (Roque y col., 2009) y desde las últimas décadas, es considerada como una de las más importantes enfermedades de los peces y el *Streptococcus* de mayor importancia como agente etiológico en los peces de cultivo (Agnew y Barnes, 2007). Las infecciones por *S. iniae* a menudo conducen altas tasas de morbilidad y mortalidad. La muerte puede ocurrir sin el acompañamiento de signos (Baums y col., 2013)

Originalmente fue aislada en delfines del zoológico de San Francisco, California y el zoológico de New York (Pier y Madin, 1976). *S. iniae*, es un coco Gram positivo, anaerobio facultativo (más común en cadenas largas), Voges-Praskauer negativo, no produce ácido a partir del sorbitol, produce ácido a partir de la sucrosa e hidroliza el almidón, catalasa negativa, es β -hemolítico en agar sangre y no reacciona con ningún grupo de la prueba de Lancefield (Roque y col., 2009).

2.4.2. Distribución mundial y especies susceptibles.

De forma general, una amplia variedad de peces de aguas templada y cálidas, desarrollan la septicemia hemorrágica y, a menudo, los signos neurológicos típicos de la infección (Gauthier, 2015). La estreptococosis en peces ha sido detectada en la mayoría de las áreas geográficas donde la temperatura del agua es adecuada para el inicio de la infección, esto incluye Norteamérica (Canada y Estados Unidos), varios países de América Central, Arabia Saudita, Japón, Sudáfrica, Israel, Gran Bretaña, Noruega y los países mediterráneos (Plumb, 1999; Roque y col., 2009). Estos patógenos ocurren tanto en aguas continentales como en aguas epi-continentales (Plumb, 1999).

Kitao (1993) enlistó 22 especies de peces que naturalmente son susceptibles a *Streptococcus spp.* Entre las más afectadas están la tilapia mozambica, la tilapia del Nilo, el cíclido cola amarilla, las anguilas, la trucha arcoíris, el ayu, el robalo rayado y sus híbridos. Otras especies menos susceptibles incluyen al bagre de canal y las carpas doradas. Plumb y col. (1974) aislaron *Streptococcus* de 10 peces marinos silvestres en estuarios del norte del Golfo de México. Otros estudios demostraron que *Enterococcus seriolicida* afecta al Cíclido cola amarilla, a las anguilas y otras especies en Japón. De acuerdo con Ferguson y col (1994), las especies del pez zebra también pueden ser susceptibles a *Streptococcus spp.* Esto demuestra, que este grupo de bacterias no tiene un hospedero específico (Plumb, 1999).

De manera particular, *Streptococcus iniae* causa septicemia y meningoencefalitis en varias especies de cultivo, (Roque y col., 2009), al menos 27 especies de peces han sido documentadas como susceptibles a la infección por *S. iniae* (Agnew y Barnes, 2007), entre las más afectadas destacan la tilapia híbrida (*Oreochromis niloticus x O. aurea*), el híbrido de robalo rayado (*Morone saxatilis x M. chrysops*), la trucha arco iris y Cíclido cola amarilla.

2.4.3. Epizootiología.

El patógeno por sí solo, es incapaz de provocar un brote epidemiológico, por lo que las condiciones ambientales son de suma importancia (Kayansamruaj y col., 2014), la infección puede ocurrir a través de la ruta olfatoria, el contacto directo (en altas densidades poblacionales) o bien, a través del canibalismo de animales moribundos o muertos a causa de la enfermedad (Amal y Zamri-Saad, 2011).

Aunque las infecciones por *Streptococcus spp.* ocurren en tilapia cultivadas en agua salada y aguas continentales, en general, las infecciones son más frecuentes y graves en los peces marinos y de agua salobre; también, se sabe que, los peces adultos y sub-adultos son el grupo más susceptible a la infección (Agnew y Barnes, 2007). La tolerancia de *Streptococcus spp.* a la salinidad en estudios *in vitro* apoya este fenómeno, pero la mayoría de los aislamientos de peces de aguas de baja salinidad no crecen en la salinidad media por encima del 3 %. Parece que los estreptococos que se adaptan a la salinidad, son generalmente menos virulentos, cuando se encuentran en un ecosistema que difiere de su origen. Las tilapias cultivadas en agua con 15 a 30 % de salinidad y de 25 a 30°C son más susceptibles a *Streptococcus* que a la misma temperatura en agua de baja salinidad (Plumb, 1999).

La dosis letal media (LD₅₀) varía según el hospedero y la ruta de infección, pero se ha demostrado que en las truchas, el barramundi y la tilapia, el intervalo va de 3×10^4 a 10^8 UFC/mL (Plumb, 1999). La infección a través el agua es el medio más popular de la transmisión de *Streptococcus spp.* (Agnew y Barnes, 2007), la vía de exposición tiene efectos sobre el curso de la enfermedad. Así por ejemplo, la exposición en baño de inmersión causa una enfermedad aguda que resulta en altos niveles de mortalidad dentro de las primeras 48 horas, mientras que la exposición oral causa un curso más prolongado (Kayansamruaj y col., 2014). Esto llevó a Bromage y Owens (2002) a proponer que el inicio de las epizootias, comienza con peces infectados a través del canibalismo o la vía fecal-oral, lo que resultó en una infección subaguda que permite la suficiente amplificación del patógeno para pasar a un nivel agudo por exposición en el agua (Kayansamruaj y col., 2014).

No todos los peces infectados con *S. iniae* muestran los signos de la enfermedad. Esta bacteria ha sido cultivada a partir de cerebro de peces sanos, lo que indica que, son capaces de portar de manera asintomática al patógeno. La bacteria frecuentemente es aislada de peces que han sobrevivido al brote, estos peces sirven como reservorio del patógeno para las futuras infecciones (Agnew y Barnes, 2007). En las granjas de tilapia y de barramundi, la temperatura es considerada el factor más importante con la incidencia de la enfermedad (Kayansamruaj y col., 2014). Cambios en la temperatura pueden encender la expresión de ciertos genes de los *Streptococcus*, lo que resultó en modificaciones de la morfología, el metabolismo y la virulencia de la bacteria. Además, cambios en la temperatura son factores de estrés en los poiquilotermos, y la desviación fuera del intervalo fisiológico de los peces reduce la respuesta inmune (Kayansamruaj y col., 2014).

En Ontario, Canadá en 1995 y hasta mediados de 1996, hubo informes de infecciones transmitidas a los seres humanos, a partir de tilapias infectadas como resultado de heridas punzantes o cortes adquiridos durante la limpieza de tilapia de la granja y desde un mercado de pescados. Las bacterias aisladas en estos humanos fueron identificadas como *S. iniae* y causaron gran preocupación para la industria de la tilapia, en particular en América del Norte. Los humanos, los delfines del Amazonas y la zorra voladora, son los únicos mamíferos que se conoce pueden ser infectados naturalmente por *S. iniae* (Agnew y Barnes, 2007). La interacción entre *S. iniae* y macrófagos es considerada crucial en la patogénesis de la infección. Además, se ha demostrado que los monocitos llevan a aproximadamente el 70% de las bacterias presentes en la sangre de los peces enfermos. Basándose en estos resultados, se postuló la teoría “caballo de Troya” que explica el mecanismo de como *S. iniae* podría entrar en el compartimento del SNC en asociación con los monocitos migrantes (Bachrach y col., 2001). La inducción de la apoptosis en los macrófagos por el α -TNF, también se ha sugerido como un mecanismo eficaz mediante el cual *S. iniae* puede evitar el cebado del sistema inmune (Baums y col., 2013).

2.4.4. Virulencia.

El sistema inmune reconoce a las proteínas de superficie y expone los epítomos como sustancias extrañas, induciendo así la respuesta inmune. Por lo que, las proteínas de superficie de las bacterias patógenas desempeñan un papel importante en la patogénesis (Wang y col., 2014). Los genes super-antígenos y la estreptolisina S pueden ser considerados los factores más importantes de virulencia que contribuyen a la rápida propagación de las infecciones de *Streptococcus spp.* (Abdelsalam y col., 2013).

Una de las vías más efectivas de las bacterias para evadir la fagocitosis, es la producción de cápsula de polisacáridos (CPS), que en algunos estreptococos varía su composición química según la especie (GAS: ácido hialurónico). Las cepas con CPS son más virulentas que las que poseen cápsulas. La presencia de cápsula, también, está implicada en la inhibición de la deposición C3 del complemento. La virulencia de *Streptococcus* se basa en gran medida por componentes de superficie antifagocíticos, donde se incluye a la proteína M (**Figura 3**), la porción N-terminal hiper-variable de estas proteínas que da lugar a diferentes tipos, que pueden ser determinados por métodos serológicos o, más exactamente, por tipificación de gen *em*, hasta la fecha se han identificado 80 serotipos, con base a la secuencia de la región hiper-variable de la misma. La súperfamilia M incluye moléculas antifagocíticas y proteínas de unión a inmunoglobulinas (Barnes y col., 2003).

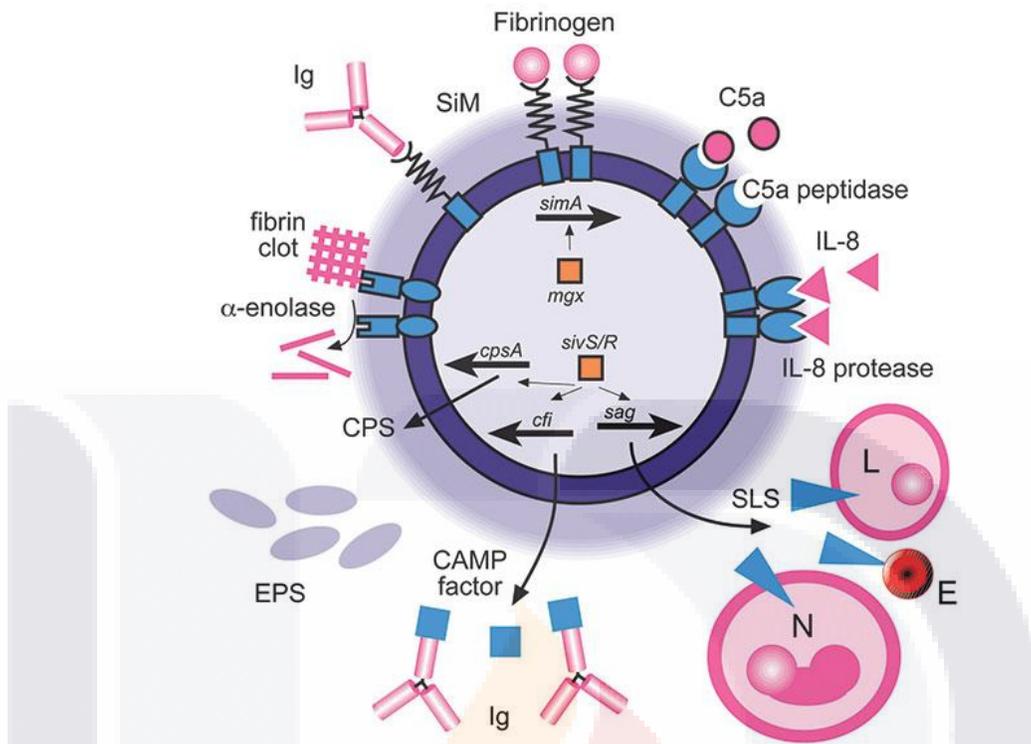


Figura 3. Factores de virulencia de *Streptococcus* spp. (Fuente: Barnes, 2009).

El factor H y la unión del fibrinógeno por la proteína M, son importantes atributos de virulencia, como la degradación de los componentes del complemento C5a por la C5a peptidasa, la resistencia a los macrófagos y la adherencia al epitelio de los peces. Se ha encontrado que los genes *simA* y *simB* en *S. iniae* son altamente conservados, sin embargo, *simA* y sus variantes se encuentran en todas las cepas virulentas. La C5a peptidasa es una proteína de superficie. En GAS, la C5a peptidasa se encuentra en sobrenadantes de cultivo, sin embargo, esto no ocurre en *S. iniae*; en el cual la C5a peptidasa tiene un peso de 123-kDa y es codificada por el gen *scpl*, que tiene estructura y funciones similares a la encontrada en GAS. La C5a peptidasa en *S. iniae* pudo haber surgido por transferencia horizontal dada su proximidad a una transposasa y a la organización genética similar a la encontrada en GAS. El intercambio alélico, ha demostrado que esta proteína por sí misma no es primordial para la virulencia en los peces y su papel en la patogénesis es menor que los otros factores. La C5a peptidasa hidroliza el factor de complemento C5a quimio-

atrayente de neutrófilos, por lo tanto deteriora la capacidad del huésped para combatir la infección (Aviles y col., 2013).

Otro de los factores de virulencia es el ácido lipoteicoico, que actúa mediante la adhesión de los estreptococos del grupo A en las células epiteliales. Otro factor conocido que contribuye a la virulencia de GAS, es la α -enolasa, que acelera la invasión a través de los tejidos del huésped y, en última instancia, en el sistema circulatorio. La α -enolasa confiere a *S. iniae* la capacidad de cruzar tejidos a través de la activación del plasminógeno. La actividad proteolítica de la plasmina en la disolución de los coágulos de fibrina, permite a los patógenos migrar más rápido a través de matrices extracelulares. La α -enolasa de *S. iniae* (≈ 50 kDa) es una enzima que se une a plasmina / plasminógeno que es 97 % similar a las α -enolasas de *S. agalactiae* y GAS (Baiano y Barnes, 2009).

Por su parte, la exotoxina pirogénica A es uno de los nueve superantígenos que contribuyen a la patogénesis del síndrome de shock tóxico estreptocócico mediante la estimulación de la producción de citoquinas por las células T, con el consiguiente daño de células endoteliales, shock hipotensivo, y necrosis basada en la isquemia. Las enzimas que disuelven los coágulos de fibrina y otras moléculas tóxicas somáticas y solubles también participan. La unión de los componentes del plasma puede permitir a los organismos evadir la detección inmune del huésped o evitar los efectos opsonofagocíticos del complemento (Baiano y Barnes, 2009).

La interleucina 8 (IL-8) es producida por el hospedero en respuesta a los estímulos como los lipo-polisacáridos, el virus y otras citosinas. La IL-8 proteasa tiene la capacidad de degradar la IL-8, lo que resulta en el incremento a la resistencia al ataque por neutrófilos y con ello la exitosa diseminación de la enfermedad. La IL-8 proteasa de *S. iniae* es codificada por el gen *cepI* y es homólogo al gen *cepA* de GAS. La habilidad de *S. iniae* para hemolizar eritrocitos y dañar las membranas de las células del hospedero resulta de la actividad de las citolisinas. Esta característica de los GBS es considerada como el principal factor de virulencia en las infecciones por *Streptococcus spp* (Baiano y Barnes, 2009).

La citolisina que posee *S. iniae* es homóloga a la estreptolisina S (SLS) de GAS, y afecta a los eritrocitos, los neutrófilos, los linfocitos y otro tipo de tejidos, pero no

tiene participación en la resistencia a la fagocitosis, ni en la adherencia a las células epiteliales. La estreptolisina O (SLO), producida por *Streptococcus spp.* de los grupos A, C y G, es una toxina que se une al colesterol con efectos potentes que dañan la membrana, debido a la inserción en la membrana con la formación de un canal hidrófilo. Esta toxicidad, se ve reflejada con el ataque a neutrófilos, a plaquetas, a células del miocardio y a subcomponentes celulares de la membrana (Songer y Post, 2005). La estreptolisina O, se inactiva en presencia de oxígeno y su medición mediante la antiestreptolisina O sugiere una infección reciente por estreptococos, mientras que la estreptolisina S permanece estable en presencia de oxígeno, y su producción es inducida por el suero y es el agente causal de las zonas hemolíticas alrededor de las colonias (Baiano y Barnes, 2009).

En *S. iniae*, se conocen nueve genes responsables de la formación de SLS, que son homólogos en un 73% con los genes que participan en la formación de SLS en GAS. Las propiedades citotóxicas de SLS hacia las células de los peces y la probable presencia de trauma cerebrovascular, representan un factor de virulencia importante en la patogénesis de *S. iniae* (Baiano y Barnes, 2009). La expresión de muchos de los genes de virulencia de GBS son regulados por arriba de 38 a 40°C (Kayansamruaj y col., 2014). Hasta donde se sabe, el aumento de la temperatura entre 28 y 35°C afecta fuertemente la virulencia de GBS causantes de streptococcosis en tilapia del Nilo (Kayansamruaj y col., 2014). Mientras que la virulencia de *S. dysgalactiae* (GCSD) se basa principalmente en las características de la superficie celular, tales como hemaglutinación y las propiedades hidrofóbicas que determinan la adhesión e invasión del patógeno a las células epiteliales del hospedero así como la exotoxina G; ya que, hasta el momento los GCSD aislados en peces no poseen genes *emm* codificantes de la proteína M (Abdelsalam y col., 2013).

2.4.5. Signos y manifestaciones patológicas.

Los signos clínicos de la estreptococosis son los siguientes: exoftalmia con hemorragias en el ojo, opacidad ocular, ennegrecimiento y petequias en la piel y dentro de los opérculos, congestión en aletas pectorales, aleta caudal y la boca. Internamente, se presenta congestión y enteritis hemorrágica. La histología de la trucha arco iris con *Streptococcus* muestra abscesos en los músculos abdominales, con necrosis de coagulación en el centro, el hígado con necrosis focal y la infiltración de linfocitos, el tejido ocular con hiperemia y hemorragias sub-retinianas (Roque y col., 2009; Zamri-Saad y col., 2010).

Los signos clínicos de *Streptococcus spp.* en tilapia no son particularmente específicos, pero generalmente, los peces infectados adquieren coloración oscura, se muestran con letargo, exhiben nado errático, en espiral, y cuerpo curvado. También presentan distensión abdominal, exoftalmia (**Figura 4**) con hemorragias y corneas opacas. Pueden ocurrir hemorragias difusas en el opérculo, piel y base de las aletas. Estas lesiones son usualmente superficiales que las asociadas con aeromoniasis o vibriosos, pero en ocasiones se puede convertir en úlceras necróticas. Puede existir fluido mucoso con sangre en el intestino grueso exudado por el ano. Los hallazgos internos incluyen exudados sanguinolentos, algunas veces gelatinosos en la cavidad abdominal, el hígado pálido, el tracto digestivo hiperémico, el bazo casi negro y el colon descendente que se muestra flácido e hiperémico. Los signos clínicos de la estreptococosis en otras especies de peces son similares (Plumb, 1999).



Figura 4- Exoftalmia bilateral en juvenil de *Oreochromis niloticus*, signo distintivo de la infección por *Streptococcus spp* en una unidad productiva de Aguascalientes, México (Fuente: elaboración propia).

La bacteremia general puede causar la infiltración de bacterias con macrófagos y granulomas en las lesiones infectadas del epicardio, el peritoneo, el intestino, el cerebro, los ovarios y los testículos. Rasheed y col. (1985), encontraron que el bazo de peces infectados eran 10 veces más grandes que lo normal, la pulpa esplénica estaba severamente congestionada y algunas células presentaban necrosis y las bacterias fagocitadas se multiplicaban en los macrófagos, el hígado de estos peces, era edematoso con los sinusoides dilatados y los hepatocitos atrofiados y con necrosis focal. Kimura y Kusuda (1979), descubrieron que el riñón y la pulpa del bazo son más conducentes ante un número alto de bacterias de lo que son la sangre, el hígado o los intestinos. En adición, las infecciones por *Enterococcus sp.* producen en el hospedero una respuesta similar, pero clínicamente indistinguible de las infecciones por *Streptococcus spp.* (Plumb, 1999).

2.4.6. Tratamientos.

Varios tratamientos han sido probados para combatir la streptococcosis. Darwin y Griffin (2002) encontraron que la oxitetraciclina es efectiva para el control de *Streptococcus iniae* en tilapia azul (*Oreochromis aureus*). En sus experimentos, la oxitetraciclina fue incorporada en el alimento a razón de 0, 25, 50, 75 y 100 mg/kg de peso. Las dosis de 75 y 100 mg/kg, incrementaron significativamente la supervivencia de los peces infectados de un 7% a un 85 y 98%, respectivamente. Algunos reportes concluyen que la eritromicina es efectiva contra infecciones por *Streptococcus spp.* en el Cíclido cola amarilla y la trucha arco iris a una dosis de 25 a 50 mg/kg/día de cuatro a siete días. Aunque, las infecciones estreptocócicas responden a los antibióticos legalmente controlados, existe el inconveniente que el tiempo de retiro es más largo de lo que la infección estreptocócica vuelve a manifestarse. Además, *Streptococcus spp.* ha desarrollado resistencia a los antibióticos. Por lo tanto, el tratamiento con antibióticos es generalmente ineficaz y la necesidad de la vacuna adecuada se ha convertido en una necesidad (Amal y Zamri-Saad, 2011).

2.4.7. Vacunación.

La vacunación es una herramienta preventiva usada en el manejo sanitario como estrategia para el control de enfermedades infecciosas (**Figura 5**). En la acuicultura, el desarrollo y uso de vacunas está teniendo un rápido progreso en los últimos años. El objetivo de la vacunación es proporcionar una fuerte respuesta inmune ante un antígeno administrado que es capaz de producir protección adquirida a largo plazo contra un patógeno. Las vacunas muertas son generalmente administradas por vía intraperitoneal (IP) o por inyección intramuscular (IM) (Barnes y col., 2003). La vacunación es considerada un método poco rentable en términos de mano de obra y tiempo (Cristea y col., 2012).



Figura 5. Proceso de vacunación de juveniles de tilapia (Fuente: Revista AQUA, 2014: <http://www.aqua.cl/2014/10/30/en-mexico-destacan-prevencion-de-enfermedades-en-cultivo-de-tilapia/>).

Las vacunas muertas se consideran más seguras que las vacunas vivas modificadas, ya que pueden revertir a la virulencia. En consecuencia, las tendencias futuras pueden incluir la administración oral de la vacuna o en baño de inmersión (Agnew y Barnes, 2007). La primera vacuna muerta fue desarrollada en Israel para evitar pérdidas en la trucha a causa de la infección por *S. iniae*. La mortalidad de la trucha arco iris inmunizadas por vía intraperitoneal con *S. iniae* atenuado con formalina fue del 5%, mientras que en la trucha arco iris no inmunizada, la

mortalidad superó el 50%. También, se han desarrollado vacunas con células enteras y proteínas bacterianas contra *S. agalactiae*. Mientras que, *S. iniae* muerto suplementado con sus productos extracelulares (ECP), fue efectivo en tilapia, reduciendo la mortalidad en un 91.3% en tilapia inmunizada vía IP a los 30 días post infección, con una supervivencia relativa del 95 % (Amal y Zamri-Saad, 2011).

2.4.8. Medidas preventivas.

Si el agente está presente en el lodo y el agua, evitar la entrada es casi imposible. Sin embargo, es recomendable comprar lotes libres de patógenos, poner en cuarentena a los peces nuevos, reducir el hacinamiento, evitar la sobrealimentación, mantener los suministros de agua separadas para cada sistemas de cultivo, minimizar la manipulación o el transporte innecesario, eliminar peces muertos o moribundos con frecuencia, y mantener excelentes condiciones sanitarias. Estas prácticas reducirán los riesgos de brote de la enfermedad. Además, es necesario mantener la limpieza periódica y desinfectar la unidad de producción; el equipo se deben mantener limpio para reducir la transmisión de patógenos, así como mantener una buena calidad del agua en los sistemas (Amal y Zamri-Saad, 2011).

2.5. Fitobióticos.

Los fitobióticos, son compuestos naturales derivados de las plantas, adicionados en las dietas para aumentar la productividad animal. Los fitobióticos tienen un amplio espectro de actividad biológica como son los antioxidantes, los antimicrobianos, los anticarcinogénicos, los insecticidas, los antiparasíticos, los anticoccidiales, los promotores del crecimiento, estimuladores de la secreción biliar y la actividad enzimática de la digestión, así como laxantes, antidiarreicos y hepatoprotección (Cristea y col., 2012).

2.5.1. Fitobióticos en la acuicultura

2.5.2. Inmunoestimulantes.

En la acuicultura, uno de los más promisorios métodos para el fortalecimiento de los mecanismos de defensa en el manejo de las enfermedades, es la administración profiláctica de inmunoestimulantes. Avances recientes sobre la inmuno-nutrición revelan que algunos nutrientes están ligados al estado inmunológico de los peces. Esto despertó el interés de los nutricionistas en el valor de la inmunoprotección de los peces además del efecto sobre el crecimiento. Muchos productos de plantas como *Eclipta alba*, *Aloe vera*, *Ocimum sanctum*, *Viscum album*, *Urtica dioica*, *Zingiber officinale*, *Solanum trilobatum*, *Astragalus radix*, *Scutellaria radix*, y *Achyranthes aspera* lograron potenciar la inmunidad de los peces (Cristea y col., 2012).

En la medicina tradicional maya y china, se utilizaba *Capsicum frutescens* debido a sus propiedades antibacterianas y antivirales, además, que es fácilmente disponible y asequible. Estudios previos reportan que el jugo crudo de *C. frutescens* fue activo contra *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Bacillus subtilis* (Ling y col., 2012). Estudios en México, reportan el uso en humanos de extractos de *Capsicum annum* contra infecciones por *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa* (Torres-Nagera y col., 2013). En la actualidad, algunos estudios han informado sobre la actividad antiparasítica de extractos de *C. frutescens* (Ling y col., 2012).

2.5.3. Promotores del crecimiento.

Experimentos realizados con la tilapia del Nilo que recibieron dietas adicionadas con extractos herbales, emulsificantes naturales y co-factores de la digestión tuvieron una mejor conversión alimenticia que los peces con dietas sin aditivos (Cristea y col., 2012). Otro estudio, mostró que la adición de diferentes extractos (*Massa medicata*, *Crataegi fructus*, *Artemisia capillaries* y *Cnidium officinale*) promovieron el crecimiento y la inmunidad no específica de *Pagrus major* (Reverter y col., 2014). En otro experimento, una amplia variedad de hierbas fueron evaluadas en la infección de tilapia (*O. niloticus*) contra *A. hydrophila* y se demostró que el extracto de *Psidium guajava* en etanol obtuvo el más alto nivel de actividad antimicrobial (Cristea y col., 2012). También, se evaluó la resistencia de *O. niloticus* contra *A. hydrophila* utilizando polen crudo y polen en etanol como inmunoestimulante y sus efectos en el crecimiento. Se encontró que el extracto de polen con etanol mejor el crecimiento, la inmunidad y la resistencia de la tilapia del Nilo frente *A. hydrophila* comparado con el polen crudo (El-Asely y col., 2014).

2.6. Carotenoides.

2.6.1. Características.

Los carotenoides son pigmentos naturales metabolizados por plantas, algas y bacterias fotosintéticas (Saini y col., 2015), son los responsables del color amarillo, naranja y rojo de las distintas variedades de chiles (Ortiz-Moreno y col., 2012) y tienen una estructura básica de 40 átomos de carbono (Monego y col., 2017). Se clasifican en dos grupos en base al grupo funcional; xantofilas (contienen oxígeno como grupo funcional), incluidas la luteína y zeaxantina, y los carotenos, que contienen una sola cadena de carbonos sin ningún grupo funcional, como el α -caroteno, β -caroteno y licopeno (**Figura 6**).

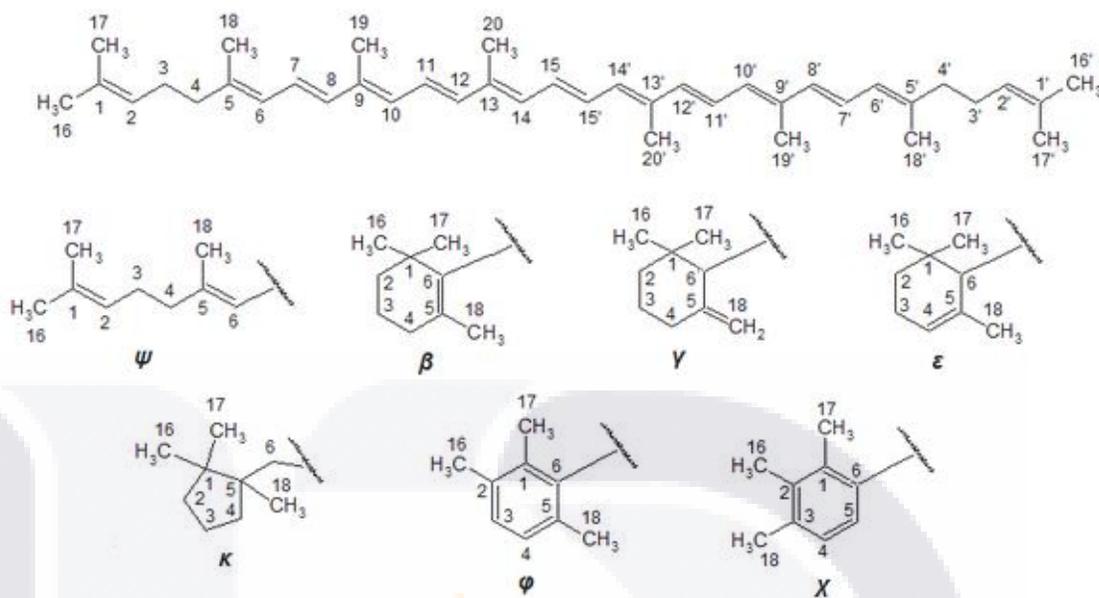


Figura 6. Numeración y clave con letras griegas de acuerdo a las estructuras posibles de los extremos del caroteno (Fuente: https://es.wikipedia.org/wiki/Carotenoide#/media/File:Carotenes_numbering.png).

Los carotenos tienen usos versátiles en las industrias de alimentos, cosméticos y farmacéutica (Saini y col., 2015). Algunos carotenoides se absorben bien y son rápidamente metabolizados, algunos otros, son absorbidos, pero son metabolizados en menor medida y otros carotenoides no pueden ser absorbidos ni metabolizados. La absorción y el metabolismo de los carotenoides tiene una fuerte relación con la estructura molecular (Torrissen y Christiansen, 1995).

2.6.2. Uso de los carotenoides en la acuicultura.

Los peces son incapaces de sintetizar carotenoides *de novo*, la mejor forma de obtenerlos es a través de la dieta (Page y col., 2005). La astaxantina es el principal pigmento aislado, seguido de la luteína y la tunaxantina (Simpson y Katayama, 1981).

En base a la biosíntesis de astaxantina, los animales acuáticos pueden dividirse en tres grupos. Grupo I. Los animales que pueden convertir zeaxantina o luteína en

astaxantina, pero los β -carotenos no son el mayor precursor de astaxantina. Pueden transferir la astaxantina de la dieta hacia su cuerpo. El pez dorado, la carpa roja y la carpa elegante pertenecen a este grupo. Ellos pueden oxidar la posición 4 y 4' del anillo β -ionona pero no pueden oxidar la posición 3,3' con facilidad. Grupo II. Los animales que pueden convertir β -caroteno y zeaxantina en astaxantina. La mayoría de los crustáceos pertenecen a este grupo. Las posiciones 4, 4', 3, and 3' del anillo β -ionona son oxidados. Grupo III. Estos organismos no pueden convertir β -carotenos, luteína o zeaxantina en astaxantina, pero pueden transferir astaxantina, luteína, zeaxantina, tunaxantina, etc., a su cuerpo en forma de ésteres (Simpson y Katayama, 1981).

En la acuicultura moderna, los principales carotenoides utilizados son la astaxantina y la cantaxantina para la pigmentación del filete de salmónidos. Junto con la frescura, la pigmentación de los filetes del salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) es un importante criterio de calidad (Torrissen y Christiansen, 1995). Más allá de las funciones como pigmentadores del filete, los carotenoides tienen otras funciones en el reino animal, como los efectos pro vitamina A, antioxidantes y coloración de la piel durante la época de reproducción (Page y col., 2005). En los peces, se ha observado una preferencia para la absorción y deposición de hidroxí y ceto carotenoides. Sin embargo, el mecanismo por el que los carotenoides pasan del plasma a los tejidos y viceversa aún no está dilucidado del todo (Torrissen y Christiansen, 1995).

La inclusión de astaxantina o cantaxantina en dietas iniciales para el salmón del Atlántico, demostró un mejor crecimiento que los salmones alimentados sin carotenoides. Resultados similares se encontraron en tilapia (*Oreochromis niloticus*) y camarón kuruma (*Penaeus japonicus*). Otros estudios, encontraron mayor sobrevivencia en *P. japonicus* con el suplemento de astaxantina-cantaxantina (50/50), pero no se observó diferencias en el crecimiento y la frecuencia de la muda. La adición de cantaxantina y β -carotenos en dietas para carpas de la India, resultaron en una mejor sobrevivencia y crecimiento en comparación con las dietas convencionales (Torrissen y Christiansen, 1995). La comercialización de estos productos sintéticos es amplia porque son productos estandarizados, químicamente estables y la concentración de carotenoides es alta. Sin embargo, la incorporación

en dietas comerciales representa entre el 10% y 20% del costo total del alimento (Ingle de la Mora, y col., 2006).

Esta situación ha llevado a la búsqueda de fuentes alternativas y económicas para la obtención de carotenoides naturales, como crustáceos, levaduras, micro algas y algunas plantas. Una alternativa interesante es la utilización de extracto esterificado y saponificado de plantas, como los pétalos de cempazuchil (*Tagetes erecta*) y el chile rojo (*Capsicum annum*). En particular, el extracto esterificado o saponificado del chile ha sido estudiado por la habilidad para pigmentar la trucha arco iris y el salmón del Atlántico (Ingle de la Mora y col., 2006).



3. HIPÓTESIS.

La oleoresina de *Capsicum annum* tiene efectos favorables sobre la resistencia y desempeño de *Oreochromis niloticus*, ante la infección por *Streptococcus iniae*.



4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general.

Evaluar los efectos de la dieta con oleresina de *Capsicum annuum* sobre el estado fisiológico de juveniles de tilapia (*Oreochromis niloticus*), ante la infección por *Streptococcus iniae*.

4.2. Objetivos específicos.

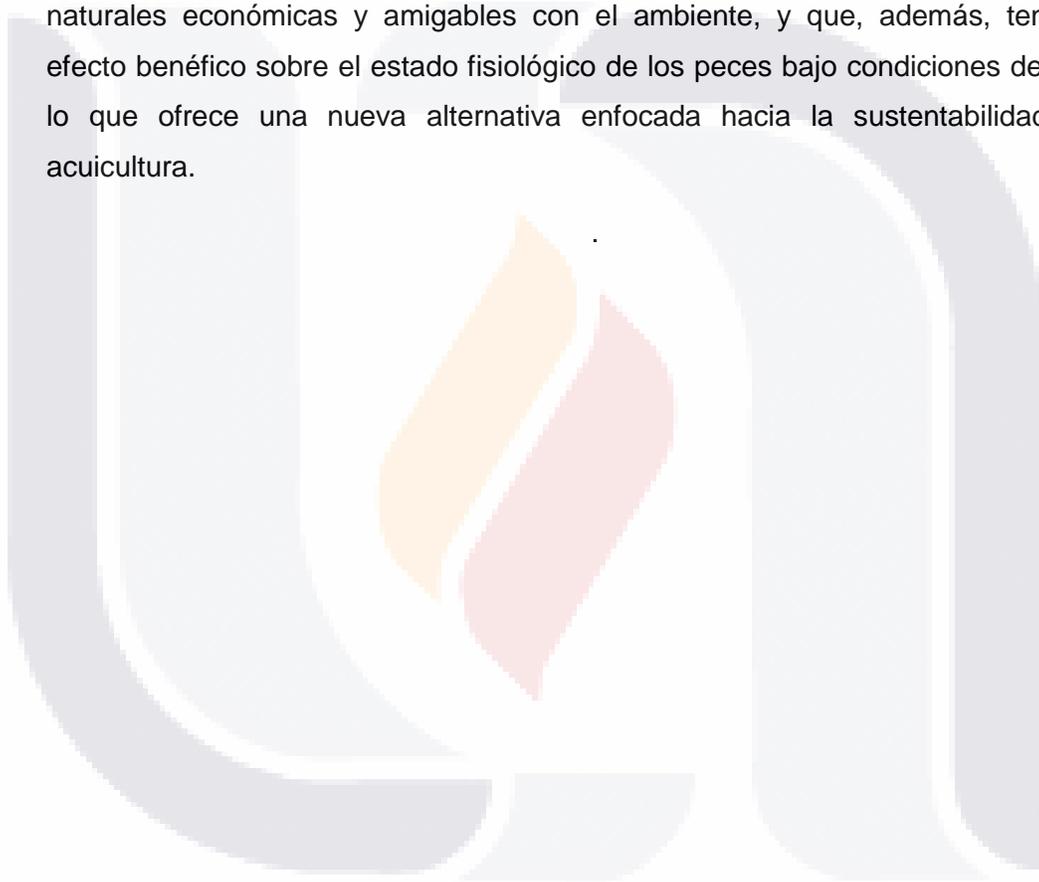
4.2.1. Describir el curso de la infección por *S. iniae* mediante las técnicas de microbiología y de los parámetros del desempeño productivo.

4.2.2. Evaluar el estado fisiológico de las tilapias en cada uno de los tratamientos, mediante el análisis de los parámetros hematológicos, la química sanguínea, los inmunológicos y los productivos.

4.2.3. Demostrar el efecto no tóxico de la oleorresina de *C. annuum* mediante el análisis de los parámetros bioquímicos y productivos.

5. JUSTIFICACIÓN.

Debido al marcado aumento en el cultivo de la tilapia, y aunado al desarrollo de sistemas intensivos de cultivo, se ha detectado un aumento en presencia de brotes infecciosos, que constituye uno de los principales factores limitantes de este sector productivo. Las bacterias del género *Streptococcus spp.* han sido consideradas como las responsables de elevadas pérdidas económicas, con un alto impacto a nivel mundial. Por esta razón, que se hace necesario encontrar alternativas naturales económicas y amigables con el ambiente, y que, además, tengan un efecto benéfico sobre el estado fisiológico de los peces bajo condiciones de cultivo, lo que ofrece una nueva alternativa enfocada hacia la sustentabilidad de la acuicultura.



6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1. Diseño Metodológico.

El presente trabajo incluyó el estudio descriptivo del curso de la infección en sub-adultos de tilapia (*Oreochromis niloticus*) infectados experimentalmente con una concentración de 1×10^4 UFC/mL con la cepa tipo ATCC 29178 de *Streptococcus iniae*. En condiciones asépticas se extrajo el cerebro, riñón, bazo, hígado y corazón de cada uno de los organismos para su posterior cultivo en placa con el medio agar sangre, a los aislamientos se les aplicaron las pruebas bioquímicas para su identificación. En la parte experimental, se utilizó un experimento completamente al azar con arreglo factorial 2x3 con medidas repetidas (MR) (Tabla 3), donde los factores fueron: a) concentración de bacteria (0 y 400 μ L de la dilución 1×10^4 UFC/mL), b) concentración de oleorresina de chile silvestre (*Capsicum annum*) extraído previamente con el método de soxhlet (utilizando hexano como solvente) a razón de 0,1 y 2 mL de extracto/kg de alimento con tres tiempo de evaluación (2,15 y 30 dpi) para evaluar la respuesta fisiológica y descartar posibles efectos tóxicos de la oleorresina. Se utilizaron 120 tilapias (20 peces por tratamiento) con peso promedio 49.9 (± 20 g) durante 30 días de experimento, con tamaño de muestra $n = 3$ por cada tratamiento, para el conteo de la serie roja, la serie blanca, el hematocrito, la hemoglobina, las proteínas totales, la albúmina, las globulinas y la IgM. Desde el inicio del experimento se llevó a cabo el registro de los parámetros de calidad de agua y los productivos para el cálculo de la ganancia de peso (GP), el Factor de Conversión Alimenticia (FCA) y la Tasa Específica de Crecimiento (TEC). Para los parámetros de desempeño productivo se utilizó un arreglo factorial 2x3 con $n = 3$ peces por tratamiento.

Tabla 3. Arreglo factorial

		Dosis ORC (mL)	0	1	2
Dosis inóculo (μ L)	0	T1	T2	T3	
	400	T4	T5	T6	

6.2. Población bajo estudio.

6.2.1. Características generales.

Se utilizaron organismos juveniles de tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultivados en condiciones controladas y en estado de salud óptimo.

6.2.2. Ubicación del experimento.

El trabajo experimental se realizó en los invernaderos de producción acuícola del Centro de Ciencias Agropecuarias (CCA) de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA), en el Municipio de Jesús María, en el estado de Aguascalientes, México (**Figura 7**).



Figura 7. Ubicación geográfica del estudio (polígono amarillo) (Fuente: elaboración propia con datos de: <https://www.google.com/maps/@21.9681275,-102.3769727,370m/data=!3m1!1e3>)

6.2.3. Los peces.

Se utilizaron un total de 120 tilapias (*O. niloticus*) con peso promedio $49.9 \text{ g} \pm 20.7 \text{ g}$, colectados en el predio “El Taray”, en el municipio El Llano, Aguascalientes ($21^\circ 54' 8.3'' \text{ N} - 102^\circ 7' 24.3'' \text{ W}$). Los peces fueron divididos en grupos de 20 individuos, y colocados en seis recipientes de plástico reforzado de 650 L, conectados a un SCR bajo condiciones de invernadero (**Figura 8**). Previo al inicio del experimento, los peces fueron aclimatados durante 11 días.



Figura 8. Sistema cerrado de recirculación, donde se llevó acabo el experimento (Fuente: elaboración propia).

6.2.4. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.

De forma aleatoria, se colectaron 120 organismos juveniles de tilapia en aparente buen estado de salud, con talla preferentemente mayor o igual a 40 g para una fácil manipulación. Se seleccionaron de forma aleatoria tres peces por cada tratamiento; estos organismos fueron puncionados del pedúnculo caudal con jeringa de tuberculina (calibre 27) para la obtención de la sangre. Cada muestra, fue dividida en un micro-tubo de tapa color lila (con EDTA) y un micro-tubo de tapa color roja (sin anticoagulante). Se descartaron las muestras coaguladas o hemolizadas.

6.3. Cepa *Streptococcus.iniae*.

La cepa tipo ATCC (American Type Culture Collection) número 29178, se consiguió en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) en Mazatlán, México (**Figura 9**).



Figura 9. Crecimiento y β -hemólisis de *S. iniae* a las 48 h de incubación a 37°C en agar sangre (Fuente: elaboración propia).

6.4. Calidad del agua.

La calidad de agua del SRC fue evaluada con el fotómetro modelo 83099 marca HANNA. La temperatura y oxígeno disuelto se monitorearon diariamente, el pH, el amoníaco, los nitritos y los nitratos se evaluaron una vez por semana. La dureza total y la alcalinidad total se registraron cada 14 días (**Figura 10**). Los resultados obtenidos a lo largo de experimento fueron los siguientes: la temperatura del agua se mantuvo en promedio a 26.2 °C (± 1.9), el pH 8.5 (± 0.1), el oxígeno disuelto (O.D.) en 6.5 mg/L (± 1.1), el amoníaco (NH₃) en 0.2 mg/L (± 0.2), el nitrito (NO₂-N) en 4.8 mg/L (± 2.1), el nitrato (NO₃-N) en 5.0 mg/L (± 6.0), la dureza total en 726.5 mg/L (± 12.0) y la alcalinidad 313.1mg/L (± 20.2).



Figura 10. Izquierda: Equipo para evaluación de los parámetros fisicoquímicos de la calidad de agua. Centro: muestra para determinación de la dureza total. Derecha: muestra de amonio y el blanco correspondiente (Fuente: elaboración propia).

6.5. Oleorresina de *Capsicum annum*.

Se utilizó el método de extracción Soxhlet reportado por Borges (1997). Se tomó 1 y 2 mL de oleorresina (según el tratamiento) y se diluyó en 100 mL de agua destilada para cada tratamiento.

6.6. Dietas experimentales.

Se utilizó el alimento comercial marca PURINA® (diámetro 1.5 mm, 44% proteína y 15% grasa). Las diluciones de oleorresina fueron aplicadas por aspersión manual (**Figura 11**). Se aplicó a una tasa de alimentación del 4% de la biomasa total y se alimentó con dos raciones por día (8:00 am y 17:00 pm).



Figura 11. Aplicación por aspersión de la ORC en el alimento (Fuente: elaboración propia).

6.7. Técnicas para la obtención de la información sustantiva.

6.7.1. Hematocrito. Se colocó la sangre colectada anticoagulante, en un 70-80% de volumen de un tubo y después se selló un extremo por calor. Se centrifugó durante 5 minutos a 12,000 rpm. La lectura se efectuó en un lector de micro-hematocrito marca SOLBAT (México). El valor calculado se expresó como % (Figura 12).

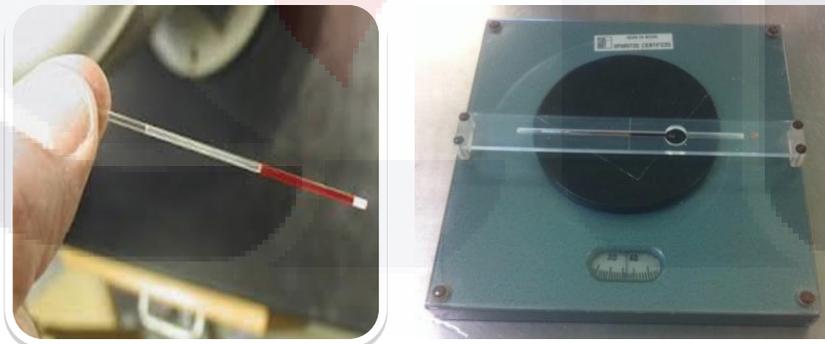


Figura 12. Instrumentos para medición de micro-hematocrito (Fuente: elaboración propia).

6.7.2. Recuentos totales de glóbulos rojos y blancos. Se preparó la solución colorante de Natt-Herrick's de acuerdo con Rodger (2010). La sangre con EDTA se colocó en una pipeta hematocimétrica para eritrocitos hasta la marca de 0.5 y se agregó la solución colorante hasta la marca de 101 para obtener una dilución 1:200 (**Figura 13**). La pipeta se colocó en agitación por un min y se dejó reposar por cinco min. Se desecharon las primeras cuatro gotas de la mezcla y se colocó una gota en una cámara de Neubauer. La lectura se realizó en un microscopio óptico compuesto con el objetivo 40x. Para los eritrocitos se contabilizaron las células de los cinco recuadros grandes (cuatro en las esquinas y uno en el centro) de la cámara de Neubauer, para los leucocitos se contabilizaron los 16 recuadros pequeños del centro de la cámara. Los resultados se expresaron como cél.x $10^6/\mu\text{L}$ para eritrocitos y cél. x $10^3/\mu\text{L}$ para leucocitos.



Figura 13. Izquierda: pipeta para eritrocitos con muestra de sangre. Derecha: pipeta con sangre y solución Natt Herricks para el conteo de glóbulos rojos y blancos (Fuente: elaboración propia).

6.7.3. Hemoglobina. Para la cuantificación de la hemoglobina se utilizó el reactivo de cianometahemoglobina de la marca POINTE SCIENTIFIC® (MI, USA). Se colocó cinco μL de cada muestra más un mL del reactivo. La mezcla se incubó a temperatura ambiente por tres min. La absorbancia fue medida a 540 nm en el espectrofotómetro RA-50 (BAYER ®, Alemania). Los resultados obtenidos fueron expresados en g/dL.

6.7.4. Proteínas plasmáticas. La medición de las proteínas plasmáticas se realizó con un refractómetro, previamente calibrado con agua destilada. Se colocó una gota de plasma y se efectuó la lectura. Los resultados fueron expresados en g/dL.

6.7.5. Albúmina. Se utilizó cinco μL de muestra (suero o plasma) más un mL del reactivo verde de bromocresol de la marca SPINREACT® (Girona, España) con una incubación a temperatura ambiente por 10 min. La lectura se efectuó a 620 nm en el equipo RA-50 (BAYER®, Alemania) (**Figura 14**). Los resultados obtenidos se expresaron en g/dL.

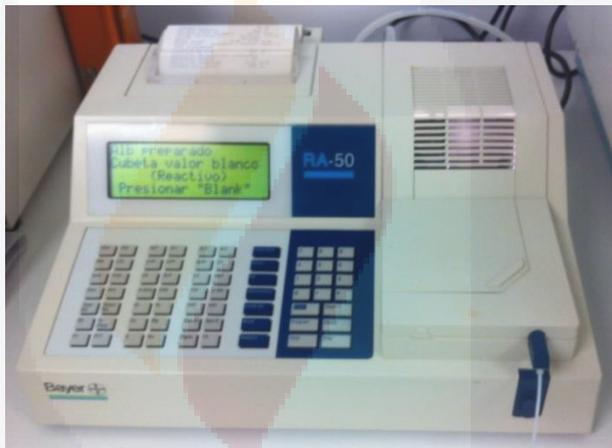


Figura 14. Equipo RA-50 utilizado para evaluar la química sanguínea (Fuente: elaboración propia).

6.7.6. Globulinas. Los valores de globulinas se obtuvieron mediante la siguiente ecuación: *Proteínas totales – Albúmina*. Los resultados se expresaron en g/dL.

6.7.7. IgM. Se cuantificó mediante turbidimetría con un kit comercial de la marca SPINREACT® (Girona, España). Se utilizó 10 μL de cada muestra más 800 μL del reactivo uno y se hizo la primera lectura de absorbancia a 340 nm en el espectrofotómetro UV-VIS Biotraza® modelo 752 (**Figura 15**), inmediatamente después, se adicionaron 200 μL del reactivo dos. Se dejó en incubación por 2 min a 37°C en un baño húmedo marca ICB® modelo HHSA y se efectuó la segunda

lectura de absorbancia a la misma longitud de onda. Los valores finales de absorbancia se obtuvieron con la ecuación: $Abs2 - Abs1$. Estos valores se ajustaron con la ecuación de regresión lineal: $y = 0.0012x + 0.0508$ con coeficiente de regresión de 1 para obtener la concentración de IgM expresada en mg/dL



Figura 15. Izquierda: baño húmedo. Derecha: Espectrofotómetro utilizado para medición de la IgM (Fuente: elaboración propia).

6.7.8. Crecimiento. Para hacer los cálculos del desempeño productivo, durante cada muestreo se pesaron y midieron los organismos. La longitud total (LT) fue evaluada mediante un ictiómetro graduado en cm. Para estimar el peso total (PT) se utilizó una balanza analítica graduada en gramos (OHAUS, US) (**Figura 16**).



Figura 16. Izquierda: medición de longitud total (LT) en ictiómetro. Derecha: obtención del peso total (PT) cada individuo por tratamiento (Fuente: elaboración propia).

6.7.9 Ganancia de peso (GP). Se evaluó la (GP) mediante la siguiente fórmula: = *Peso final (g) – Peso inicial(g)*

6.7.10. FCA. El Factor de Conversión alimenticia fue calculado como sigue:

$$\frac{\text{Alimento consumido(kg)}}{\text{Ganancia de peso (kg)}}$$

6.7.11. TEC. La Tasa de Crecimiento Específico se calculó de la siguiente manera:
$$\frac{\ln pf - \ln pi}{\text{tiempo} * 100}$$

6.8. Modelo estadístico. El modelo estadístico a seguir para evaluar el diseño completamente al azar fue el siguiente:

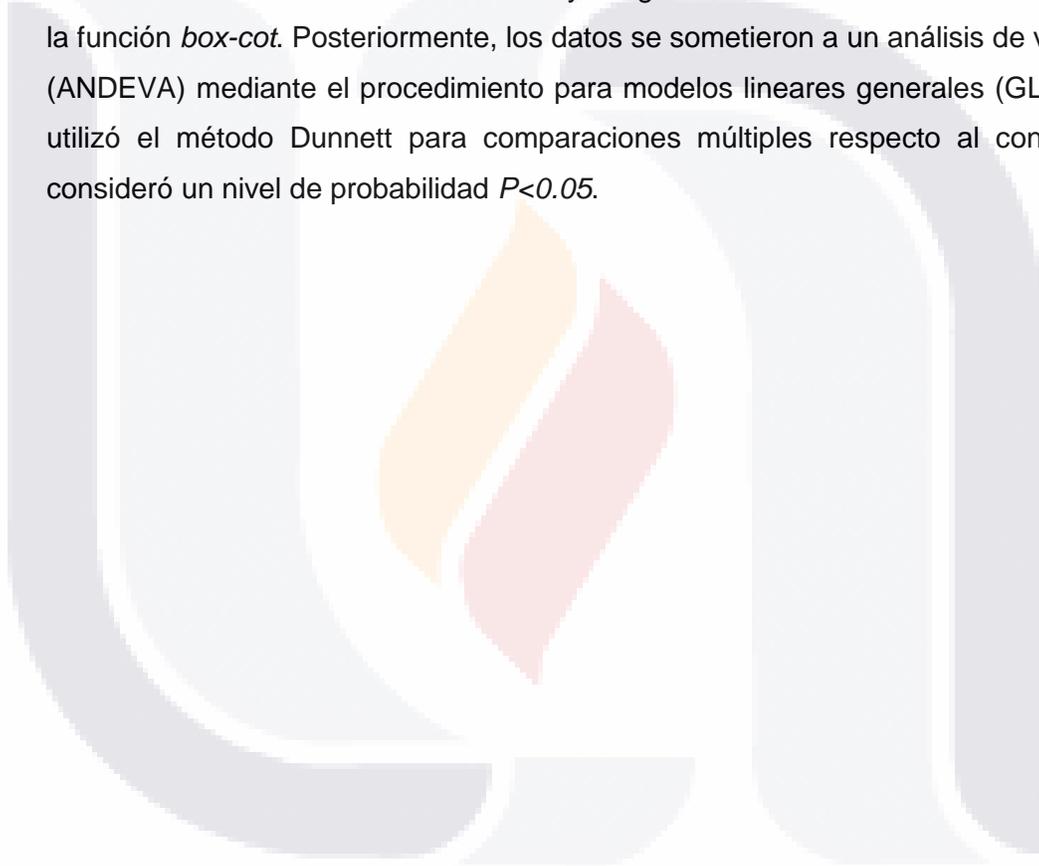
$$Y = A + B + C + A * B + A * C + B * C + A * B * C + \epsilon$$

Dónde:

- Y = variable respuesta
- A = dosis de inóculo
- B = dosis ORC
- C = tiempo de evaluación
- ϵ = error aleatorio

6.8.1. Pruebas estadísticas.

Los datos de todas las variables cuantitativas que se obtuvieron en los muestreos realizados fueron capturados y ordenados en una hoja electrónica de Microsoft Excel® para facilitar su análisis. Se utilizó el software MINITAB® 17 para comprobar el supuesto de normalidad con la prueba de Shaphiro Wilks y el supuesto de homocedasticidad con la prueba de Levene. Las variables que no cumplieron estos supuestos, se transformaron con la función *log*, a excepción del hematocrito que fue transformado con la función: *arco-seno* y los glóbulos blancos se transformaron con la función *box-cot*. Posteriormente, los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANDEVA) mediante el procedimiento para modelos lineares generales (GLM) y se utilizó el método Dunnett para comparaciones múltiples respecto al control. Se consideró un nivel de probabilidad $P < 0.05$.



7. RESULTADOS.

7.1. Curso de la infección

No se logró aislar el agente en los peces inoculados. Tampoco se observó mortalidad ni signos de *S. iniae* en ningún tratamiento (**Figura 17**).



Figura 17. Izquierda: placa de agar sangre con isopado de corazón de tilapia del tratamiento tres sin crecimiento bacteriano a las 48 h de incubación a 37 ° C. Derecha: tilapia del tratamiento tres sin signos de estreptococosis (Fuente: elaboración propia).

7.2. Hematología.

7.2.1. Serie roja.

Los conteos de glóbulos rojos no presentaron diferencias significativas ($P>0.05$) entre los diferentes tratamientos., al igual que la concentración de la hemoglobina. Los valores del hematocito en los tratamientos tres y seis fueron diferentes ($P<0.05$) desde el inicio hasta el término del experimento, así como el tratamiento 1 a los 30 dpi (**Figura 18**).

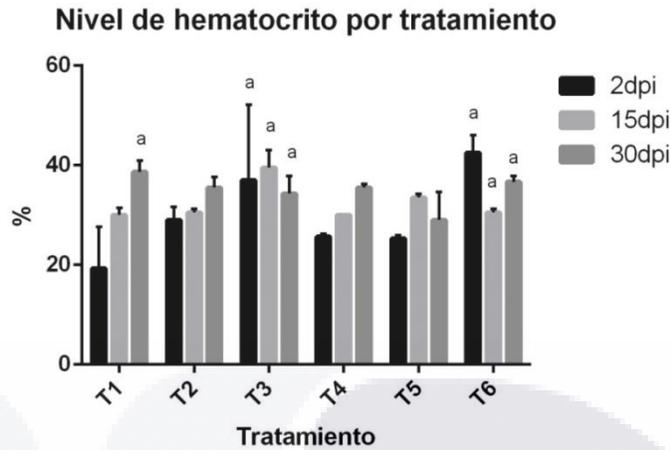


Figura 18. Valores de hematocrito (%) por tratamiento. Columnas con letra diferente indican los grupos con diferencias significativas ($P < 0.05$). Los tratamientos tres y seis presentan diferencias significativas durante todo el experimento, al igual que el tratamiento uno a los 30 dpi.

7.2.2. Serie blanca.

Los valores para glóbulos blancos fueron significativamente mayores en todos los tratamientos a los dos dpi ($P < 0.05$); se observó un ligero incremento en los grupos infectados respecto a los grupos no infectados, sin embargo este incremento no presenta diferencias estadísticas (Figura 19).

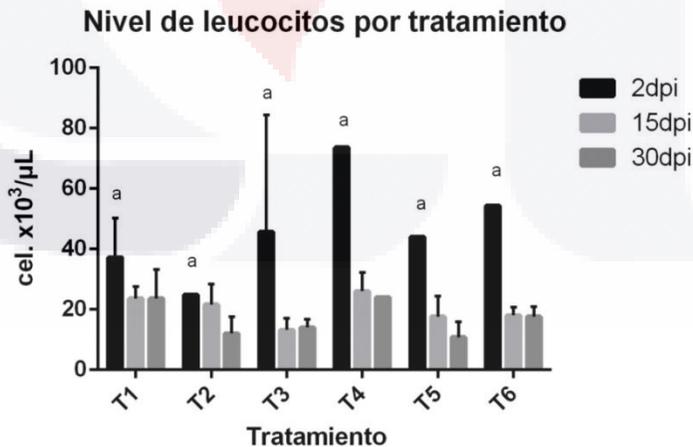


Figura 19. Conteo de leucocitos por tratamiento. Columnas con letra indican diferencias significativas ($P < 0.05$). Se observó un aumento significativo en todos los tratamientos a los 2dpi.

7.3. Química sanguínea.

Se encontró una disminución significativa en los valores de proteínas totales a los 30 dpi en los tratamientos tres y seis. Mientras que, el tratamiento dos a los 15 dpi y el tratamiento cinco a los 2 dpi fueron significativamente mayores al resto de los tratamientos ($P<0.05$) (Figura 20). Los valores de la albúmina presentaron un decremento significativo ($P<0.05$) en los tratamientos tres y seis desde el inicio, hasta el término del experimento (Figura 21).

Valores de proteínas plasmáticas por tratamiento

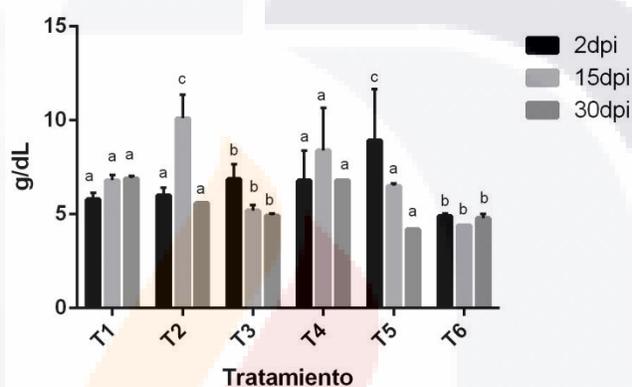


Figura 20. Concentración promedio de proteínas plasmáticas (g/dL) por tratamiento. Las columnas con diferente letra indican diferencias significativas ($P<0.05$). Tratamientos cinco y seis presentan disminución significativa a los 30 dpi. Tratamiento dos a los 15 dpi y tratamiento cinco a los 2 dpi presentan los valores más altos.

Valores de albúmina por tratamiento

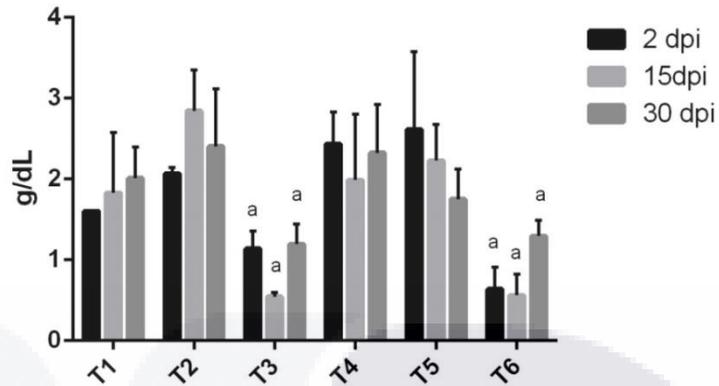


Figura 21. Concentración promedio de albúmina (g/dL) por tratamiento. Las columnas con diferente letra indican diferencias significativas ($P < 0.05$). Tratamiento tres y seis presentaron diferencias significativas durante todo el experimento.

Respecto a la globulina, no se observan diferencias significativas entre tratamientos ($P > 0.05$), En este trabajo se observaron niveles superiores de globulinas respecto a la albúmina La relación albúmina/globulina más alta con significancia estadística, se registró a los 30 dpi en los tratamientos dos y cinco. Se observó una disminución en los tratamientos tres y seis (Figura 22).

Valores de relación A/G por tratamiento

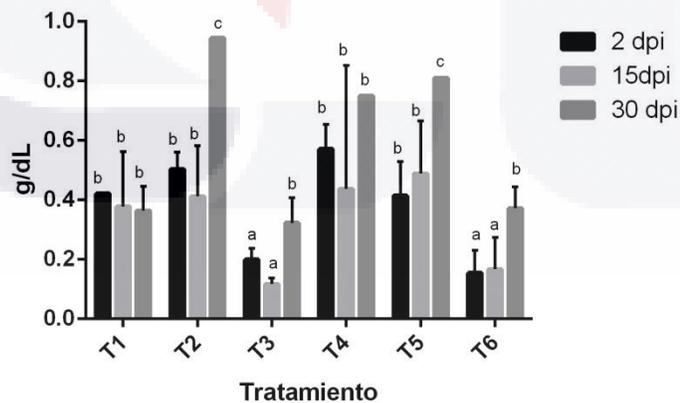


Figura 22. Concentración promedio de la relación albúmina/globulina por tratamiento. Las columnas con diferente letra indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

7.4. Parámetros inmunológicos.

Los tratamientos que recibieron ORC (tratamientos: dos, tres, cinco y seis) presentaron un incremento significativo en la concentración de IgM respecto al control. Los niveles más altos de IgM se observaron a los 15 dpi, sin embargo, este incremento no presentó significancia estadística ($P>0.05$) (Figuras 23 al 29).

Nivel de IgM por tratamiento

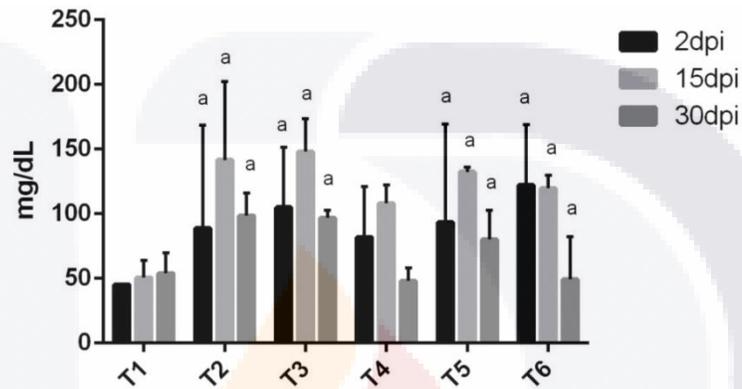


Figura 23. Concentración promedio de IgM por tratamiento. Las columnas con diferente letra indican diferencias significativas ($P<0.05$).

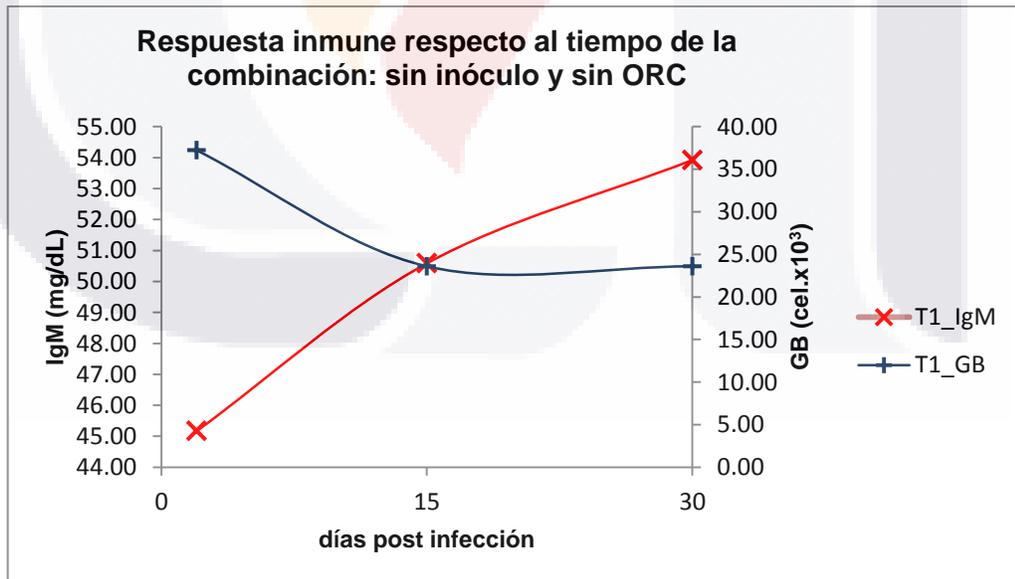


Figura 24. Respuesta inmune respecto al tiempo, mediada por IgM y glóbulos blancos (GB) en el tratamiento uno. Se observa la tendencia descendente de los glóbulos blancos respecto al tiempo y la tendencia ascendente de la IgM en el mismo periodo de tiempo.

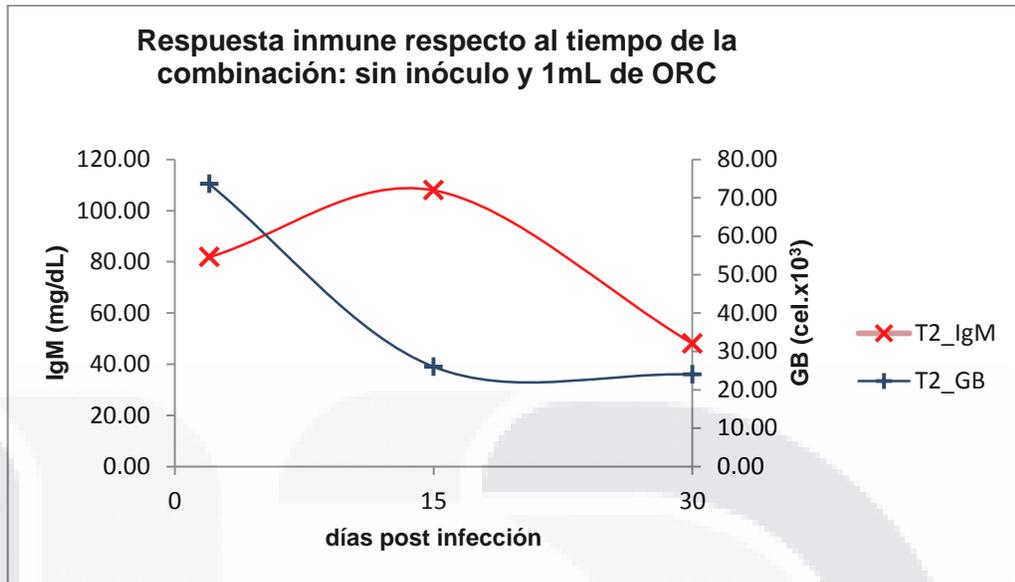


Figura 25. Respuesta inmune respecto al tiempo, mediada por IgM y glóbulos blancos (GB) en el tratamiento dos. Se observa la tendencia descendente de los glóbulos blancos respecto al tiempo y la tendencia ascendente de la concentración de la IgM a los 15 dpi y el posterior descenso de esta concentración cercana a los valores iniciales.

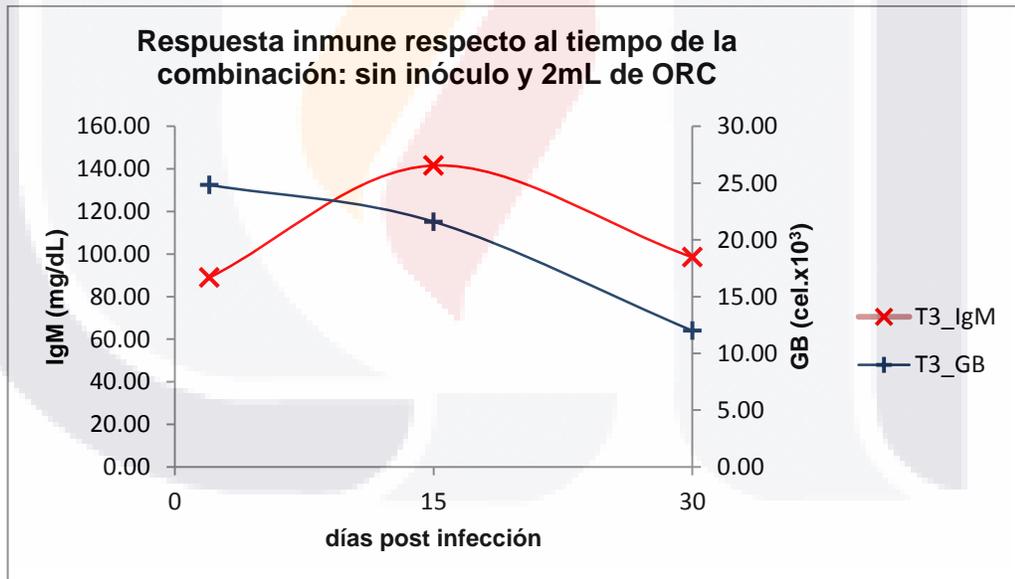


Figura 26. Respuesta inmune respecto al tiempo, mediada por IgM y glóbulos blancos (GB) en el tratamiento tres. Se observa la tendencia descendente de los glóbulos blancos respecto al tiempo y la tendencia ascendente de la concentración de la IgM a los 15 dpi y el posterior descenso de esta concentración cercana a los valores iniciales.

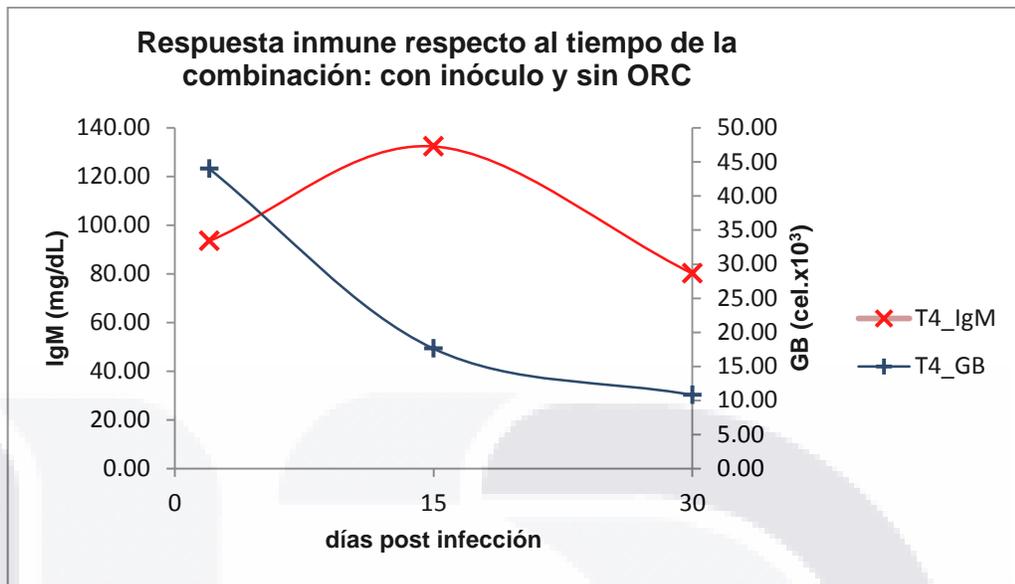


Figura 27. Respuesta inmune respecto al tiempo, mediada por IgM y glóbulos blancos (GB) en el tratamiento cuatro. Se observa la tendencia descendente de los glóbulos blancos respecto al tiempo y la tendencia ascendente de la concentración de la IgM a los 15 dpi y el posterior descenso de esta concentración cercana a los valores iniciales.

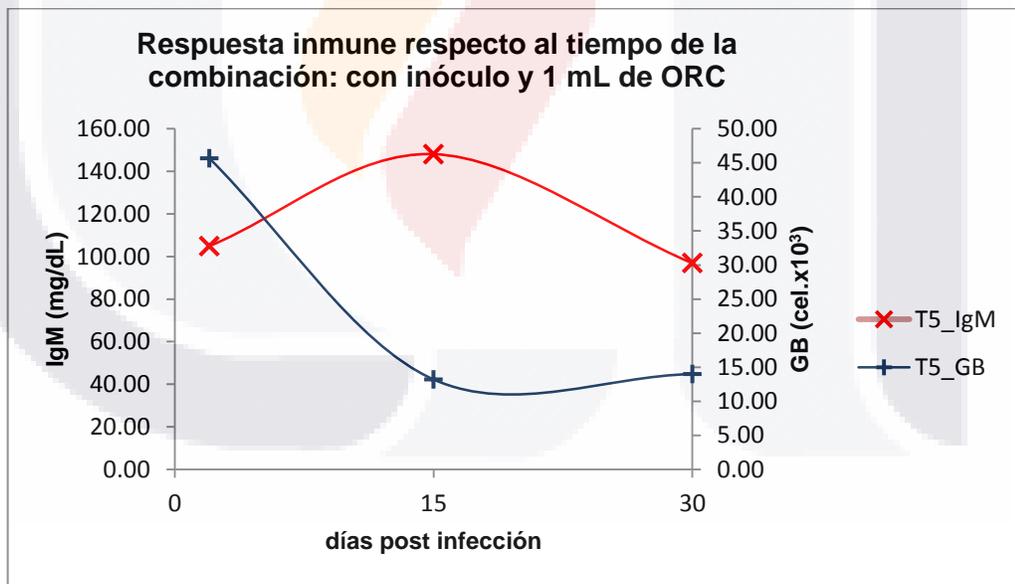


Figura 28. Respuesta inmune respecto al tiempo, mediada por IgM y glóbulos blancos (GB) en el tratamiento cinco. Se observa la tendencia descendente de los glóbulos blancos respecto al tiempo y la tendencia ascendente de la concentración de la IgM a los 15 dpi y el posterior descenso de esta concentración cercana a los valores iniciales.

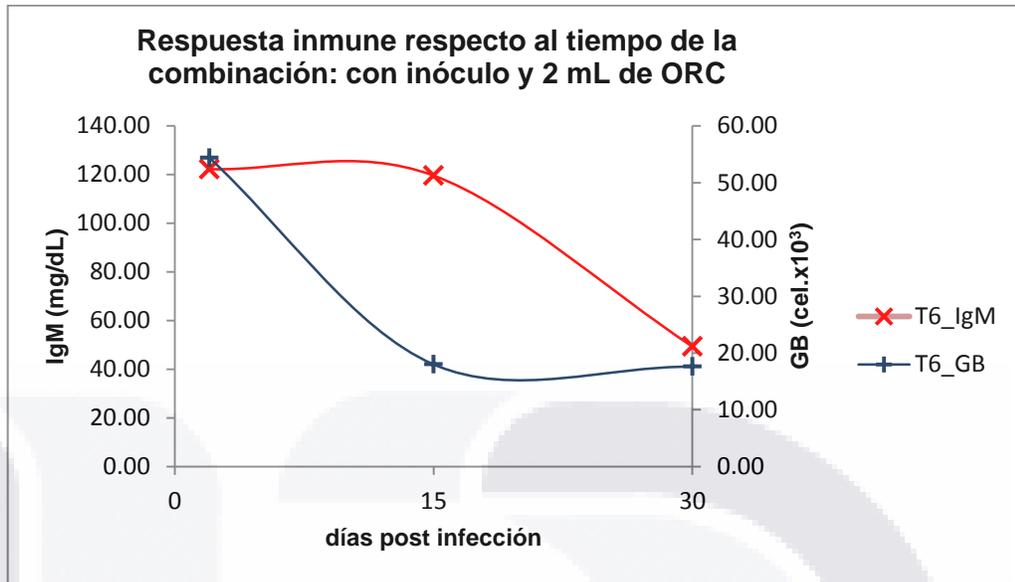


Figura 29. Respuesta inmune respecto al tiempo, mediada por IgM y glóbulos blancos (GB) en el tratamiento seis. Se observa la tendencia descendente de los glóbulos blancos respecto al tiempo y la tendencia ascendente de la concentración de la IgM a los 15 dpi y el posterior descenso de esta concentración cercana a los valores iniciales.

7.5. Parámetros de desempeño productivo.

El FCA del tratamiento tres fue significativamente diferente ($P < 0.05$) al resto de los tratamientos con un valor de 1.18 (**Figura 30**). Este tratamiento, también presentó el mayor incremento de peso junto con el tratamiento seis (75 y 58 g respectivamente) respecto a los otros tratamientos ($P < 0.05$) (**Figura 31**). En cuanto a la ganancia de peso diario (TEC), nuevamente el tratamiento tres presentó diferencia significativa junto al tratamiento cuatro ($P < 0.05$) respecto a los otros tratamientos con un valor de 1.9 y 1.7 %/día respectivamente (**Figura 32**)

Valor promedio de FCA por tratamiento

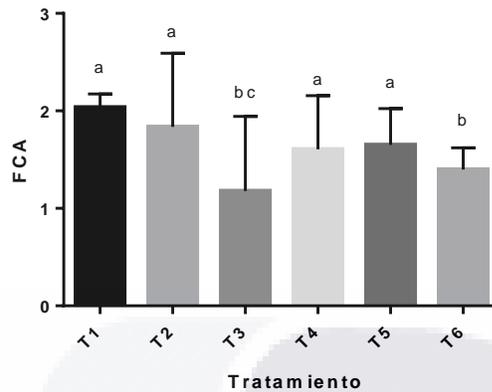


Figura 30. Valor promedio de FCA por tratamiento. Las columnas con diferente letra indican diferencias significativas ($P<0.05$). Tratamiento tres presentó el mejor aprovechamiento del alimento.

Ganancia de peso por tratamiento

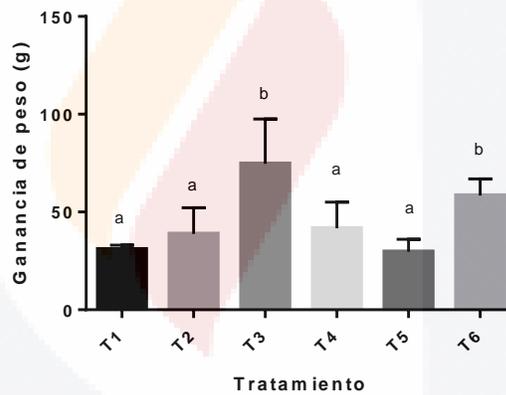


Figura 31. Valor promedio de la ganancia de peso (g) por tratamiento. Las columnas con diferente letra indican diferencias significativas ($P<0.05$). Los organismos de los tratamientos tres y seis obtuvieron mayor incremento de peso respecto a los otros tratamientos.

Valor promedio de TEC por tratamiento

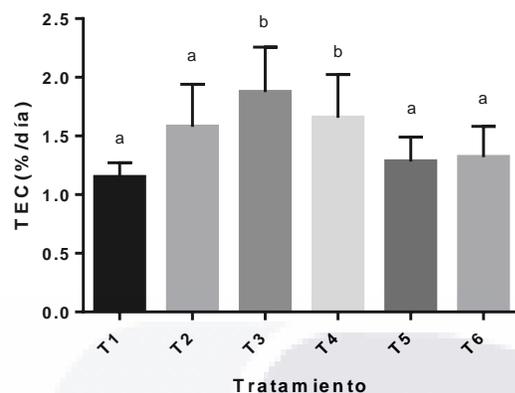


Figura 32. Valor promedio de la tasa específica de crecimiento (%/día) para cada tratamiento. Las columnas con diferente letra indican diferencias significativas ($P < 0.05$). Los tratamientos tres y cuatro presentan los valores más altos de TEC.

8. DISCUSIÓN.

8.1. Curso de la infección.

No se logró aislar el agente en los peces inoculados. Esto concuerda con Perera y col. (1994), quienes no lograron recuperar *S. iniae* de los peces infectados cuatro días después de la inoculación. Tampoco, se observó mortalidad ni signos de *S. iniae* en ningún tratamiento. Perera y col. (1994) tampoco observaron signos ni mortalidad en *O. aureus* que fue inoculada con la cepa tipo de *S. iniae* ATCC 29178. Fuller y col (2001) demostraron que la cepa ATCC 29178 no puede causar enfermedad en ratones, incluso con altas dosis de inóculo. Buchanan y col (2008) realizaron estudio *ex vivo* con la lobina rayada (*Morone chrysops x Morone saxatilis*) y encontraron que la cepa ATCC 29178 es sensible a la destrucción en la sangre, ya que existe un fenotipo sin virulencia que tiene una reducida habilidad de adherencia para la invasión intracelular de las células del huésped.

Es importante señalar, que la progresión de la enfermedad en los peces es algo variable y depende de la virulencia del agente, la susceptibilidad del huésped, la ruta de infección, la edad del pez, los factores ambientales y de la calidad del agua (Agnew y Barnes, 2007).

En este trabajo se mantuvo una temperatura promedio de $26.2 \pm 1.9^{\circ}\text{C}$ y se utilizó 44% de proteína en el alimento, lo que permitió a los organismos una adecuada resistencia contra *S. iniae*. Esto concuerda con Qiang y col. (2013), quienes mencionan que la interacción de la temperatura y el contenido de proteína del alimento pueden incrementar la resistencia de la tilapia a las enfermedades, y encontraron que a 27.9°C de temperatura y con 38.1% de proteína del alimento, se reduce la susceptibilidad de juveniles de tilapia del Nilo (*O. niloticus*) contra *S. iniae* con una mortalidad de sólo el 13.76%.

8.2. Hematología.

8.2.1. Serie roja.

Los conteos de los glóbulos rojos no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos. Los valores observados se encuentran cercanos al intervalo de 1.91-2.83 x 10⁶/μL reportados por Hrubec y col (1997).

Los valores de la concentración de hemoglobina encontrados en este estudio, se colocan ligeramente fuera del intervalo 7 a 9.8 g/dL reportado por Hrubec y col. (1997), no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos.

Los valores de hematocrito observados son similares al intervalo de 22 a 45 % obtenido por Mauel y col (2007). Los valores de los tratamientos tres y seis, difirieron significativamente ($P < 0.05$) al resto de los tratamientos y esta condición se mantuvo durante todo el experimento, ya que esta variable presenta correlación positiva con el incremento del peso de los organismos. Estos hallazgos concuerdan a los reportado por Martins y col (2008) en experimentos con tilapia inoculada con *Enterococcus sp.* Ellos demostraron que no existió la destrucción de los eritrocitos a causa del proceso infeccioso, ya que el inóculo no fue el suficiente para causar enfermedad y afectar el proceso de hematopoyesis. En experimentos realizados con *O. aureus* infectada con *Corynebacterium sp.*, una bacteria Gram positiva responsable de la mortalidad severa en tilapia, sólo se encontraron efectos subclínicos y no se observó alguna alteración en los conteos de eritrocitos (Martins y col., 2008). Estos hallazgos concuerdan con los encontrados en este estudio. Respecto a la utilización de inmunoestimulantes, en algunos estudios donde se incluyó vitamina A en dietas experimentales de tilapia infectada con *S. iniae*, se demostró un incremento significativo en los niveles de eritrocitos, hemoglobina y hematocrito durante las primeras cuatro semanas del experimento respecto al grupo control (Guimarães, y col., 2014). Situación que no se observó en este trabajo con la inclusión de oleoresina de *Capsicum annum*. Resultados similares fueron reportados por Li y col. (2011) con la inclusión de granos secos destilados en las dietas, que no lograron influir en los conteos de los glóbulos rojos y la concentración hemoglobina en la resistencia de *O. niloticus* contra *S. iniae*.

8.2.2. Serie blanca

Los valores para los glóbulos blancos fueron significativamente mayores en todos los tratamientos los 2 dpi ($P < 0.05$). Se observó un ligero incremento en los grupos infectados respecto a los grupos no infectados, sin embargo, este incremento no presentó diferencias estadísticas. Los valores para esta variable se encuentran dentro del intervalo de $18.7-151.7 \times 10^3/\mu\text{L}$ reportado por Mauel y col (2007). El incremento de glóbulos blancos, concuerda con lo observado por Martins y col. (2008) en experimentos con tilapia inoculada con 1×10^6 UFC/mL de *Enterococcus sp.* El incremento del número de leucocitos es una reacción normal del pez en periodos cortos como una respuesta contra las infecciones o las sustancias ajenas, que pueden alterar los procesos fisiológicos y aumentar las funciones inmunes no específicas; sin embargo, el conteo de glóbulos blancos se reduce con el transcurso del tiempo (Qiang, y col., 2013), patrón que se ajusta a lo observado en este trabajo (Figuras: 24 al 29).

8.3. Química sanguínea e inmunología.

8.3.1. Parámetros bioquímicos.

Los valores de proteínas plasmáticas obtenidas en este estudio, difieren del intervalo: 4.8-7.8 g/dl reportado por Hrubec y col. (1997), y superiores al resultado de 5.3 g/dL obtenido por El-Asely y col. (2014), con la utilización de polen de miel de abeja al 4% en *O. niloticus* en el desafío contra *Aeromonas hydrophila*. Se encontró una disminución significativa a los 30 dpi en los tratamientos que recibieron 2 mL de ORC con inóculo y sin inóculo (tratamientos tres y seis). Mientras que el tratamiento dos a los 15 dpi y el tratamiento cinco a los 2 dpi fueron significativamente mayores al resto de los tratamientos.

Los valores de la albúmina de este trabajo difirieron al intervalo de 1.3-2.6 g/dL propuesto por Hrubec y col. (2000) y al resultado de 1.8 g/dL reportado por El-Asely y col. (2014) con la utilización de polen de miel de abeja al 2.5% en *O. niloticus* en el desafío contra *Aeromonas hydrophila*. Se observó un decremento significativo en los organismos de los tratamientos tres y seis. Estudios previos, señalan que los análisis de regresión múltiple indican una correlación lineal entre la albúmina y la

proteína total, y se han descrito una disminución en las proteínas plasmáticas en peces con ayuno, siendo la albúmina la primera proteína plasmática en agotarse (Davis y col. 1999). Por lo que el ayuno previo a la toma de muestra, explica la disminución de los niveles de albúmina, situación que se hace más evidente en los organismos de mayor peso.

Respecto a la globulina, no se observan diferencias significativas entre los tratamientos, los valores difirieron del intervalo 1.6-4.2 g/dL (Hubrec y col., 1997) y al resultado 4.8 g/d L obtenido por El-Asely y col. (2014), con la utilización de polen de miel de abeja al 1% en *O. niloticus* en el desafío contra *Aeromonas hydrophila*. En este trabajo se observaron niveles superiores de globulinas respecto a la albúmina. Según Cnaani y col. (2004), una fuerte respuesta inmune está asociada con niveles altos de proteínas totales y globulinas, ya que cualquier aumento está relacionado con la respuesta inmune no específica (El-Asely y col., 2014). Estas observaciones corroboran los datos encontrados en el presente estudio.

Los resultados de la relación albúmina/globulina más altos con significancia estadística fueron registrados a los 30 dpi en los tratamientos dos y cinco. La mayoría de los valores se ubican dentro del intervalo de 0.4-0.8 g/dL para tilapias sanas (Mauel y col., 2007); sin embargo, los tratamientos con 2 mL de ORC, presentaron un decremento significativo, que se relaciona con los niveles bajos de albúmina a causa del ayuno y al aumento de las globulinas, lo que indica una fuerte respuesta inmune potenciado por la ORC. Según Kumar y col. (2017), la disminución de la relación A / G implica un aumento en la cantidad de inmunoglobulinas en la sangre, claramente potenciado por las habilidades anti-estrés e inmunoestimulante del Zn en la dieta de *Pangasius hypophthalmus*.

8.3.2. Parámetros inmunológicos.

Los valores de la IgM observados en este estudio, se encontraron en el intervalo de 13 a 532 mg/dL reportado por Davis y col. (1999) para *Cuplea pallasii*. En contraste, algunos valores se encuentran por debajo del límite inferior del intervalo de 60 a 1600 mg/dL para teleósteos establecido por Salinas y col. (2011).

Los tratamientos que recibieron ORC presentaron un incremento significativo respecto al control. Este hallazgo contrasta a lo reportado por Guimarães y col. (2014), quienes no encontraron influencia de diferentes concentraciones de vitamina A sobre los valores de inmunoglobulina total. Este incremento se puede asociar a los efectos de la ORC, ya que los frutos de *Capsicum spp.* contienen una mezcla compleja de compuestos activos como los carotenos, vitamina E y vitamina C (Maksimova y col., 2016).

Hu y col. (2006), indicaron que la tilapia del Nilo es capaz de convertir β -carotenos en vitamina A, por una reacción reductora. La vitamina A desempeña un papel importante en el sistema inmunológico (tanto la inmunidad innata como la inmunidad adaptativa), lo que ayuda a protegerse contra las infecciones de varias maneras (Guimarães y col., 2014).

Harabawy y Mosleh (2014), mostraron que el sistema inmune de los peces, puede ser estimulado por el uso de antioxidantes, como lo demostraron los experimentos con altas dosis de vitamina E en *Ictalurus punctatus*, así como la implementación de vitamina C y E que aumentaron la inmunidad y redujeron la mortalidad en varias especies de peces con inmunosupresión. Recientemente, se demostró la interacción sinérgica entre diferentes antioxidantes, esta sinergia brinda una amplia gama de protección comparada con el uso de un solo tipo de antioxidante (Harabawy y Mosleh, 2014).

En este trabajo, los niveles más altos de la IgM se observaron a los 15 dpi, sin embargo este incremento no fue significativo ($P>0.05$). Este resultado es similar con Guimarães y col. (2014), quienes no observaron diferencias significativas en los títulos de anticuerpo frente a *S. iniae* después de 21 días de desafío en los peces alimentados con diversas concentraciones de vitamina A. En cambio, difiere con los resultados de Vega y col. (2011), que encontraron el nivel más alto de IgM a los 31

dpi en crías de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) infectadas experimentalmente con IPNV (virus de la necrosis pancreática infecciosa).

8.4. Parámetros de desempeño

El FCA del tratamiento 3 fue significativamente ($P<0.05$) diferente al resto de los tratamientos con un valor de 1.18. Hu y col (2006) no observaron diferencias significativas en el FCA con la inclusión de 0 a 200 mg de β -caroteno/kg de alimento, con valores de FCA mayores a los obtenidos en este trabajo. En contraste, la utilización de 50,000 UI/kg de la vitamina A, mejoró la conversión de alimento con valores de 1.0 (Hu y col., 2006). En comparación con otros inmuno-estimulantes, Ü Acar y col. (2015), reportaron un FCA de 1.31 en la utilización de 1 % de aceite de naranja en *O. mossambicus* contra *S. iniae*. Por su parte, Yunis y col. (2015), indicaron un FCA de 1.41 en los grupos alimentados con 450 mg/kg de alimento de *Uncaria tomentosa* en la resistencia de *O. niloticus* vs *S. iniae*.

Los tratamientos tres y seis presentaron el mayor incremento de peso (75 y 58 g respectivamente) respecto a los otros tratamientos; éste incremento fue superior a los 50.27 g reportados por Yunis-Aguinaga y col., (2015) con la inclusión de 450 mg de *Uncaria tomentosa* por kilo de alimento para tilapia.

En cuanto a la ganancia de peso diario (TEC) el tratamiento tres presentó diferencias significativas respecto a los otros tratamientos con un valor de 1.9%/día. Este valor es similar al 1.95 % obtenido por Ü- Acar y col. (2015), e inferior al 2.39 % reportado por Yunis y col (2015).

Los datos sobre el desempeño de las tilapias obtenidos en este trabajo, demuestran que no existió un efecto antinutricional o tóxico de la oleorresina sobre el crecimiento de la tilapia; esta evidencia se apoya en los datos bioquímicos de este trabajo y en las investigaciones de Segner y col (1989), quienes demostraron, que la astaxantina en niveles elevados no induce alteraciones patológicas en el hígado de *O. niloticus* y *Colisa labiosa*, y tiene una influencia positiva en la histología hepática de los peces.

9. CONCLUSIONES.

1. No se logró aislar el agente infeccioso en ningún tratamiento, ni se observaron signos de *S. iniae*.
2. No se observó mortalidad en ningún tratamiento.
3. *S. iniae* ATCC 29178 no afectó el proceso de hematopoyesis.
4. La ORC no tuvo efectos sobre los parámetros hematológicos.
5. No se observaron alteraciones en el perfil bioquímico asociadas con el agente infeccioso o la ORC.
6. Se demostró que 1 mL de oleorresina no saponificada de *Capsicum annuum* mezclada con el alimento balanceado durante 41 días fue suficiente para aumentar el nivel de IgM.
7. Se demostró que 2 mL de oleorresina no saponificada de *Capsicum annuum* mezclada con el alimento balanceado durante 41 días fue suficiente para mejorar el desempeño de *O. niloticus*.
8. No se encontró evidencia sobre toxicidad ni efectos anti-nutricionales de la ORC.

10. BIBLIOGRAFÍA.

- Abdelsalam, M., Asheg, A., & Eissa, A. E. (2013). *Streptococcus dysgalactiae*: An emerging pathogen of fishes and mammals. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 1(1), 1–6. <http://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2013.04.002>
- Abdullah, S., Omar, N., Yusoff, S. M., Obukwho, E. B., Nwunuji, T. P., Hanan, L., & Samad, J. (2013). Clinicopathological features and immunohistochemical detection of antigens in acute experimental *Streptococcus agalactiae* infection in red tilapia (*Oreochromis spp.*). *SpringerPlus*, 2(1), 286. <http://doi.org/10.1186/2193-1801-2-286>
- Acar, Ü., Kesbiç, O. S., Yılmaz, S., Gültepe, N., & Türker, A. (2015). Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*. *Aquaculture*, 437, 282–286. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.12.015>
- Agnew, W., & Barnes, A. C. (2007). *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. *Veterinary Microbiology*, 122(1–2), 1–15. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.03.002>
- Amal, M. N. a, & Zamri-Saad, M. (2011a). Streptococcosis in Tilapia (*Oreochromis niloticus*): A review. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 34(2), 195–206.
- Amal, M. N. a, & Zamri-Saad, M. (2011b). Streptococcosis in Tilapia (*Oreochromis niloticus*): A review. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 34(2), 195–206.
- Arredondo, J. L., & Lozano, S. (2003). *La Acuicultura en México*. México D.F.
- Aviles, F., Zhang, M. M., Chan, J., Delamare-Deboutteville, J., Green, T. J., Dang, C., & Barnes, A. C. (2013). The conserved surface M-protein SiMA of *Streptococcus iniae* is not effective as a cross-protective vaccine against differing capsular serotypes in farmed fish. *Veterinary Microbiology*, 162(1), 151–159. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.08.018>

- Bachrach, G., Zlotkin, A., Hurvitz, A., Evans, D. L., & Eldar, A. V. I. (2001). Recovery of *Streptococcus iniae* from Diseased Fish Previously Vaccinated with a Streptococcus Vaccine. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8), 3756–3758. <http://doi.org/10.1128/AEM.67.8.3756>
- Baiano, J. C. F., & Barnes, A. C. (2009). Towards control of *Streptococcus iniae*. *Emerging Infectious Diseases*, 15(12), 1891–1896. <http://doi.org/10.3201/eid1512.090232>
- Barnes, A. C., Horne, M. T., & Ellis, A. E. (2003). *Streptococcus iniae* expresses a cell surface non-immune trout immunoglobulin-binding factor when grown in normal trout serum. *Fish and Shellfish Immunology*, 15(5), 425–431. [http://doi.org/10.1016/S1050-4648\(03\)00021-4](http://doi.org/10.1016/S1050-4648(03)00021-4)
- Barnes, A. C., Young, F. M., Horne, M. T., & Ellis, A. E. (2003). *Streptococcus iniae*: Serological differences, presence of capsule and resistance to immune serum killing. *Diseases of Aquatic Organisms*, 53(3), 241–247. <http://doi.org/10.3354/dao053241>
- Baums, C. G., Hermeyer, K., Leimbach, S., Adamek, M., Czerny, C. P., Hörstgen-Schwark, G., Steinhagen, D. (2013). Establishment of a model of *Streptococcus iniae* meningoencephalitis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Comparative Pathology*, 149, 94–102. <http://doi.org/10.1016/j.jcpa.2012.10.003>
- Borges, P. P. (1997). Obtención de oleorresina de pimentón dulce. *Alimentaria*, 59–60.
- Cnaani, A., Tinman, S., Avidar, Y., Ron, M., & Hulata, G. (2004). Comparative study of biochemical parameters in response to stress in *Oreochromis aureus*, *O. mossambicus* and two strains of *O. niloticus*. *Aquaculture Research*, 35(15), 1434–1440. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01167.x>
- Colquhoun, D. J., & Duodu, S. (2011). Francisella infections in farmed and wild aquatic organisms. *Veterinary Research*, 42(1), 47. <http://doi.org/10.1186/1297-9716-42-47>
- Cristea, V., Antache, A., Grecu, I., Docan, A., Dediu, L., & Cre, M. (2012). The Use of Phytobiotics in Aquaculture. *Lucraci Stiintifice - Seria Zootehnie*, 57, 250–255.

- El-Asely, A. M., Abbass, A. a, & Austin, B. (2014). Honey bee pollen improves growth, immunity and protection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against infection with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*, 40(2), 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.07.017>
- FAO. (2012). El estado mundial de la pesca y acuicultura. Departamento de la pesca y la acuicultura. Roma:
- Gauthier, D. T. (2015). Bacterial zoonoses of fishes: A review and appraisal of evidence for linkages between fish and human infections. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 203(1), 27–35. <http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.10.028>
- Hernández, M., Ortiz-moreno, A., Hernández, D., Dorantes-alvarez, L., & Necochea-mondragon, H. (2012). Anti-Inflammatory Effects of Carotenoids Extracted from Dried Pepper (*Capsicum annum* L .). *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012. <http://doi.org/10.1155/2012/524019>
- Ingle de la Mora, G., Arredondo-Figueroa, J. L., Ponce-Palafox, J. T., Barriga-Sosa, I. D. A., & Vernon-Carter, J. E. (2006). Comparison of red chilli (*Capsicum annum*) oleoresin and astaxanthin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillet pigmentation. *Aquaculture*, 258, 487–495. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.005>
- Kayansamruaj, P., Pirarat, N., Hirono, I., & Rodkhum, C. (2014). Increasing of temperature induces pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* and the up-regulation of inflammatory related genes in infected Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Veterinary Microbiology*, 172(1–2), 265–271. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.04.013>
- Ling, F., Wang, J.-G., Lu, C., Wang, G.-X., Lui, Y.-H., & Gong, X.-N. (2012). Effects of aqueous extract of *Capsicum frutescens* (Solanaceae) against the fish ectoparasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Parasitology Research*, 111(2), 841–8. <http://doi.org/10.1007/s00436-012-2907-9>
- Mian, G. F., Godoy, D. T., Leal, C. a G., Yuhara, T. Y., Costa, G. M., & Figueiredo, H. C. P. (2009). Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology*, 136(1–2), 180–183.

<http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.10.016>

Monego, D. L., Barcellos, M., & Cícero, P. (2017). Applications of computational chemistry to the study of the antiradical activity of carotenoids : A review. *Food Chemistry*, 217, 37–44. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.073>

Morrison, R. N., & Nowak, B. F. (2002). The antibody response of teleost fish. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 11(1), 46–54. <http://doi.org/10.1053/saep.2002.28241>

Page, G. I., Russell, P. M., & Davies, S. J. (2005). Dietary carotenoid pigment supplementation influences hepatic lipid and mucopolysaccharide levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), 142, 398–402. <http://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.09.001>

Plumb, J. A. (1999). *Health maintenance and principal microbial disease of cultured fishes*. Iowa: CRC Press.

Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., & Sasal, P. (2014). Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. *Aquaculture*, 433, 50–61. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.048>

Rodger, H. D. (2010). *Fish Disease Manual*.

Roque, A., Soto Rodríguez, S. A., & Gómez Gil, B. (2009). *Aquaculture Microbiology and Biotechnology*.

SAGARPA. (2016). (S. d. Pesquera, Ed.) Obtenido de Atlas Agroalimentario: http://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2016/Atlas-Agroalimentario-2016.

Saini, R. K., Nile, S. H., & Park, S. W. (2015). Carotenoids from fruits and vegetables : Chemistry , analysis , occurrence , bioavailability and biological activities. *FRIN*, 76, 735–750. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.047>

Simpson, K. L., & Katayama, T. (1981). *CAROTENOIDS IN FISH FEEDS. Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors: Technological and Nutritional Applications*. ACADEMIC PRESS, INC. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-082850-0.50011-1>.

Songer, J., & Post, K. (2005). *Veterinary Microbiology: Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease*. ELSEVIER SAUNDERS.

Torres-nagera, M. A., López-lópez, L. I., De La Cruz-galicia, G., & Silva-belmares, S. Y. (2013). Solanaceas Mexicanas: Una Fuente de Nuevos Agentes Farmacológicos Mexican Solanaceae. *Revista Científica de La Universidad Autónoma de Coahuila*, 5(10), 27–32.

Torrissen, B. J., & Christiansen, R. (1995). Requirements for carotenoids in fish diets, 11, 225–230.

Wang, Y.-T., Huang, H.-Y., Tsai, M.-A., Wang, P.-C., Jiang, B.-H., & Chen, S.-C. (2014). Phosphoglycerate kinase enhanced immunity of the whole cell of *Streptococcus agalactiae* in tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 41(2), 250–9. <http://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.09.008>

Wu, Y., Gong, Q., Fang, H., Liang, W., Chen, M., & He, R. (2013). Effect of *Sophora flavescens* on non-specific immune response of tilapia (GIFT *Oreochromis niloticus*) and disease resistance against *Streptococcus agalactiae*. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(1), 220–7. <http://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.10.020>

ANEXOS

Anexo A: Análisis estadístico de la variable glóbulos rojos

Anexo B: Análisis estadístico de la variable hemoglobina

Anexo C: Análisis estadístico de la variable hematocrito

Anexo D: Análisis estadístico de la variable glóbulos blancos

Anexo E: Análisis estadístico de la variable proteínas plasmáticas

Anexo F: Análisis estadístico de la variable albúmina

Anexo G: Análisis estadístico de la variable globulinas

Anexo H: Análisis estadístico de la variable relación albúmina/globulinas

Anexo I: Análisis estadístico de la variable la IgM

Anexo J: Análisis estadístico de la variable ganancia de peso

Anexo K: Análisis estadístico de la variable TEC

Anexo L: Análisis estadístico de la variable FCA

ANEXO A

Tabla 1. Análisis de varianza de la variable glóbulos rojos.

FV	GL	SC	CM	F	P
Dosis infección	1	0.0050	0.00498	0.01	0.918
Dosis ORC	2	3.0821	1.54106	3.34	0.051
Dpi	2	1.3714	0.68571	1.49	0.245
Dosis infección*dosis ORC	2	0.5710	0.28550	0.62	0.546
Dosis*dpi	2	0.1359	0.06797	0.15	0.864
Dosis ORC*dpi	4	4.5472	1.13679	2.46	0.070
Dosis infección*dosis ORC*dpi	4	1.4723	0.36808	0.80	0.538
Error	26	11.9951	0.46135		
Total	43	23.1443			

FV: Fuente de Variación, GL: Grados de Libertad, SC: Suma de Cuadrados, CM: Suma de Cuadrados Medios, P: significancia.

ANEXO B

Tabla 1. Análisis de varianza de la variable hemoglobina.

FV	GL	SC	CM	F	P
Dosis infección	1	7.995	7.9950	2.41	0.134
Dosis ORC	2	9.101	4.5506	1.37	0.273
Dpi	2	22.618	11.3090	3.41	0.050
Dosis infección*dosis ORC	2	0.265	0.1327	0.04	0.961
Dosis*dpi	2	12.357	6.1785	1.86	0.177
Dosis ORC*dpi	4	18.753	4.6883	1.41	0.259
Dosis infección*dosis ORC*dpi	4	5.723	1.4307	0.43	0.784
Error	24	79.558	3.3149		
Total	41	165.158			

FV: Fuente de Variación, GL: Grados de Libertad, SC: Suma de Cuadrados, CM: Suma de Cuadrados Medios, P: significancia.

ANEXO C

Tabla 1. Análisis de varianza de la variable Hematocrito.

FV	GL	SC	CM	F	P
Dosis infección	1	0.000468	0.000468	0.15	0.705
Dosis ORC	2	0.047493	0.023746	7.42	0.003
Dpi	2	0.021462	0.010731	3.35	0.051
Dosis infección*dosis ORC	2	0.002156	0.001078	0.34	0.717
Dosis*dpi	2	0.006787	0.003393	1.06	0.361
Dosis ORC*dpi	4	0.057016	0.014254	4.45	0.007
Dosis infección*dosis ORC*dpi	4	0.020313	0.005078	1.59	0.208
Error	26	0.083235	0.003201		
Total	43	0.248827			

FV: Fuente de Variación, GL: Grados de Libertad, SC: Suma de Cuadrados, CM: Suma de Cuadrados Medios, P: significancia.

Tabla 2. Prueba de Dunnett para la variable Hematocrito, factor dosis ORC.

Dosis ORC (mL)	N	Media	Grupos
0 (CONTROL)	15	1.26680	A
1	14	1.26089	A
2	15	1.19341	

Medias sin letra A son significativamente diferentes respecto a la media del control.

Tabla 3. Prueba de Dunnett para la variable Hematocrito, interacción dosis ORC*dpi

Dosis ORC*dpi	N	Media	Grupos
0 2 (control)	6	1.34351	A
1 2	6	1.29558	A
0 15	4	1.26610	A
1 15	4	1.24502	A
1 30	4	1.24207	A
2 15	4	1.21271	
2 30	6	1.20776	
0 30	5	1.19079	
2 2	5	1.15975	

Medias sin letra A son significativamente diferentes respecto a la media del control.

ANEXO D

Tabla 1. Análisis de varianza de la variable glóbulos blancos

FV	GL	SC	CM	F	P
Dosis infección	1	0.003203	0.003203	1.55	0.232
Dosis ORC	2	0.014489	0.007245	3.51	0.056
Dpi	2	0.045745	0.022873	11.07	0.001
Dosis infección*dosis ORC	2	0.001461	0.000730	0.35	0.708
Dosis*dpi	2	0.002218	0.001109	0.54	0.595
Dosis ORC*tiempo	4	0.009387	0.002347	1.14	0.377
Dosis infección*dosis ORC*dpi	4	0.001316	0.000329	0.16	0.956
Error	15	0.030987	0.002066		
Total	32	0.116771			

FV: Fuente de Variación, GL: Grados de Libertad, SC: Suma de Cuadrados, CM: Suma de Cuadrados Medios, P: significancia.

Tabla 2. Prueba de Dunnett para la variable glóbulos blancos, factor dpi

Dpi	N	Media	Grupos
2 (control)	10	0.157933	A
30	11	0.257677	
15	12	0.231126	

Medias sin letra A son significativamente diferentes respecto a la media del control.



ANEXO E

Tabla 1. Análisis de varianza de la variable proteínas totales

FV	GL	SC	CM	F	P
Dosis infección	1	0.006510	0.006510	1.55	0.226
Dosis ORC	2	0.118139	0.059069	14.05	0.000
Dpi	2	0.039090	0.019545	4.65	0.021
Dosis infección*dosis ORC	2	0.025394	0.012697	3.02	0.069
Dosis*dpi	2	0.014692	0.007346	1.75	0.197
Dosis ORC*dpi	4	0.075300	0.018825	4.48	0.008
Dosis infección*dosis ORC*dpi	4	0.081664	0.020416	4.86	0.006
Error	22	0.092470	0.004203		
Total	39	0.469344			

FV: Fuente de Variación, GL: Grados de Libertad, SC: Suma de Cuadrados, CM: Suma de Cuadrados Medios, P: significancia.

Tabla 2. Prueba de Dunnett para la variable proteínas totales, factor dosis ORC

dosis ORC (mL)	N	Media	Grupos
0 (control)	13	0.834425	A
1	12	0.816743	A
2	15	0.709663	

Medias sin letra A son significativamente diferentes respecto a la media del control.

Tabla 3. Prueba de Dunnett para la variable proteínas totales, factor dpi

Dpi	N	Media	Grupos
2 (control)	17	0.804171	A
15	12	0.820527	A
30	11	0.736133	

Medias sin letra A son significativamente diferentes respecto a la media del control.



Tabla 4. Prueba de Dunnett para la variable proteínas totales, interacción dosis ORC*dpi

Dosis infección*dosis ORC*dpi	N	Media	Grupos
0 2 2 (control)	3	0.76290	A
0 1 15	2	1.00259	
400 1 2	3	0.93606	
400 0 15	2	0.91625	A
0 0 30	2	0.83880	A
0 2 2	3	0.83469	A
400 0 30	1	0.83251	A
0 0 15	2	0.83232	A
400 0 2	3	0.82376	A
400 1 15	2	0.81286	A
0 1 2	3	0.77751	A
0 1 30	1	0.74819	A
0 2 15	2	0.71568	A
0 2 30	3	0.69306	A
400 2 2	2	0.69011	A
400 2 30	3	0.68099	A
400 2 15	2	0.64345	A
400 1 30	1	0.62325	A

Medias sin letra A son significativamente diferentes respecto a la media del control.

ANEXO F

Tabla 1. Análisis de varianza de la variable albúmina

FV	GL	SC	CM	F	P
Dosis infección	1	0.0054	0.00537	0.02	0.886
Dosis ORC	2	17.2035	8.60175	33.33	0.000
Dpi	2	0.2184	0.10919	0.42	0.659
Dosis infección*dosis ORC	2	0.8797	0.43985	1.70	0.200
Dosis*dpi	2	0.3622	0.18109	0.70	0.504
Dosis ORC*dpi	4	1.8197	0.45494	1.76	0.163
Dosis infección*dosis ORC*dpi	4	1.2982	0.32454	1.26	0.309
Error	29	7.4837	0.25806		
Total	46	29.2940			

FV: Fuente de Variación, GL: Grados de Libertad, SC: Suma de Cuadrados, CM: Suma de Cuadrados Medios, P: significancia.

Tabla 2. Prueba de Dunnett para la variable albúmina, factor dosis ORC

Dosis ORC (mL)	N	Media	Grupos
0 (control)	15	2.03125	A
1	16	2.31692	A
2	16	0.89583	

Medias sin letra A son significativamente diferentes respecto a la media del control.

ANEXO G

Tabla 1. Análisis de varianza de la variable globulinas

FV	GL	SC	CM	F	P
Dosis infección	1	0.007000	0.007000	0.76	0.396
Dosis ORC	2	0.034187	0.017094	1.85	0.185
Dpi	2	0.097061	0.048530	5.24	0.015
Dosis infeccion*dosis ORC	2	0.015363	0.007681	0.83	0.452
Dosis*dpi	2	0.021479	0.010740	1.16	0.335
Dosis ORC*dpi	4	0.165766	0.041442	4.47	0.010
Dosis infección*dosis ORC*dpi	4	0.084373	0.021093	2.28	0.099
Error	19	0.176000	0.009263		
Total	36	0.613049			

FV: Fuente de Variación, GL: Grados de Libertad, SC: Suma de Cuadrados, CM: Suma de Cuadrados Medios, P: significancia.

ANEXO H

Tabla 1. Análisis de varianza de la relación A/G

FV	GL	SC	CM	F	P
Dosis_bac	1	0.02485	0.024851	1.30	0.268
Dpi	2	0.37381	0.186904	9.80	0.001
Dosis_orc	2	0.88441	0.442206	23.19	0.000
Dosis_bac*dpi	2	0.01189	0.005947	0.31	0.736
Dosis_bac*dosis_orc	2	0.07883	0.039414	2.07	0.154
Dpi*dosis_orc	4	0.10169	0.025424	1.33	0.294
Dosis_bac*dpi*dosis_orc	4	0.05586	0.013966	0.73	0.581
Error	19	0.36232	0.019069		
Total	36	1.61140			

FV: Fuente de Variación, GL: Grados de Libertad, SC: Suma de Cuadrados, CM: Suma de Cuadrados Medios, P: significancia.

Tabla 2. Prueba de Dunnett para la relación A/G, dpi

Dpi	N	Media	Grupos
2 (control)	14	0.377522	A
30	11	0.594056	
15	12	0.333171	A

Medias sin letra A son significativamente diferentes respecto a la media del control.

Tabla 3. Prueba de Dunnett para la relación A/G, dosis ORC

Dosis ORC (mL)	N	Media	Grupos
0 (control)	11	0.486938	A
1	11	0.595511	A
2	15	0.222299	

Medias sin letra A son significativamente diferentes respecto a la media del control.



ANEXO I

Tabla 1. Análisis de varianza de la variable IgM

FV	GL	SC	CM	F	P
Dosis infección	1	5.3	5.32	0.00	0.955
Dosis ORC	2	14073.5	7036.73	4.39	0.024
Dpi	2	14457.7	7228.87	4.51	0.022
Dosis infeccion*dosis ORC	2	3944.2	1972.12	1.23	0.310
Dosis*dpi	2	3008.4	1504.22	0.94	0.405
Dosis ORC*dpi	4	2803.2	700.79	0.44	0.780
Dosis infección*dosis ORC*dpi	4	1757.3	439.34	0.27	0.892
Error	24	38473.0	1603.04		
Total	41	78223.2			

FV: Fuente de Variación, GL: Grados de Libertad, SC: Suma de Cuadrados, CM: Suma de Cuadrados Medios, P: significancia.

Tabla 2. Prueba de Dunnett para la variable IgM, factor dosis ORC.

Dosis ORC (mL)	N	Media	Grupos
0 (control)	13	64.589	A
2	14	106.835	
1	15	105.839	

Medias sin letra A son significativamente diferentes respecto a la media del control.

Tabla 3. Prueba de Dunnett para la variable IgM, factor dpi.

Dpi	N	Media	Grupos
2	14	89.428	A
15	16	116.696	A
30	12	71.140	A

Medias sin letra A son significativamente diferentes respecto a la media del control.

ANEXO J

Tabla 1. Análisis de varianza de la variable ganancia de peso

FV	GL	SC	CM	F	P
Tratamiento	5	1.444	0.28877	14.98	0.000
Error	67	1.291	0.01927		
Total	72	2.735			

FV: Fuente de Variación, GL: Grados de Libertad, SC: Suma de Cuadrados, CM: Suma de Cuadrados Medios, P: significancia.

Tabla 2. Prueba de Dunnett para la variable ganancia de peso.

Tratamiento	N	Media	Grupos
1 (control)	3	1.4893	A
6	15	1.8420	
5	13	1.7621	
2	15	1.5992	A
3	12	1.5631	A
4	15	1.4623	A

Medias sin letra A son significativamente diferentes respecto a la media del control.

ANEXO K

Tabla 1. Análisis de varianza de la variable TEC.

FV	GL	SC	CM	F	P
Tratamiento	5	3.959	0.7917	7.71	0.000
Error	67	6.882	0.1027		
Total	72	10.841			

FV: Fuente de Variación, GL: Grados de Libertad, SC: Suma de Cuadrados, CM: Suma de Cuadrados Medios, P: significancia.

Tabla 2. Prueba de Dunnett para la variable TEC

Tratamiento	N	Media	Grupos
1 (control)	3	1.1490	A
5	15	1.8735	
2	15	1.6553	
3	12	1.579	A
6	13	1.3203	A
4	15	1.2828	A

Medias sin letra A son significativamente diferentes respecto a la media del control.

ANEXO L

Tabla 1. Análisis de varianza de la variable FCA.

FV	GL	SC	CM	F	P
Tratamiento	5	0.4757	0.09514	4.94	0.001
Error	67	1.2912	0.01927		
Total	72	1.7669			

FV: Fuente de Variación, GL: Grados de Libertad, SC: Suma de Cuadrados, CM: Suma de Cuadrados Medios, P: significancia.

Tabla 2. Prueba de Dunnett para la variable FCA

Tratamiento	N	Media	Grupos
1 (control)	3	0.3078	A
3	12	0.2340	A
4	15	0.2079	A
2	15	0.1837	A
6	13	0.1410	A
5	15	0.0193	

Medias sin letra A son significativamente diferentes respecto a la media del control.