

EVALUACION DEL EFECTO BACTERICIDA DE LA CEFQUINOLONA (CQEPCA) CONTRA *Vibrio fluorens* EN TILAPIA (*Oreochromis mossambicus*)^a

Maribel García Ramos^b
Jorge Romero Jarero^c
Luis Ocampo Camberos^d
Ana Auró de Ocampo^b

RESUMEN

García RM, Romero JJ, Ocampo CL, Auró OA. *Téc Pecu Mex* 1999;37(3)23-30. Uno de los principales problemas que afectan considerablemente a la acuicultura de agua dulce y marina es sin duda, la presencia de organismos patógenos; por ejemplo los de la familia *Vibrionacea*, dentro de la cual se encuentra la especie *Vibrio fluorens*, que ocasiona en los peces hemorragias en la base de las aletas, boca y branquias, así como zonas de necrosis e inflamación de piel y músculo. Cuando los organismos infectados logran sobrevivir, quedan con cicatrices en la piel, disminuyendo su valor en el mercado. En este estudio se evaluó la efectividad de una cefquinolona (CQEPCA), que es la unión de dos moléculas (fluoroquinolona y cefalosporina) por un enlace carboxilo, la cual produce un mayor espectro antibacteriano. Con ese propósito, se infectaron experimentalmente 500 tilapias con *Vibrio fluorens* y se les administró la CQEPCA a diferentes concentraciones en dos formas distintas: en el alimento y en el agua. Observándose que el suministro del antibiótico fue más efectivo en el alimento, puesto que la mortalidad fue menor que la obtenida al adicionarse en el agua. Mediante la aplicación del análisis Probit se determinó la dosis efectiva 50% de la CQEPCA suministrada en el alimento, la cual fue de 6.56 mg/kg, mientras que en el agua fue de 20.52 mg/kg, siendo el medicamento en el alimento 1.9 veces más efectivo que en el agua.

PALABRAS CLAVE: Cefquinolona, Tilapia, *Vibrio fluorens*.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias del género *Vibrio* causantes de la vibriosis en organismos acuáticos, fueron aisladas de *Anguilla anguilla* (1) en 1893 por Canestrini (2). En Japón, algunos países europeos y en Estados

Unidos de América, se considera a esta enfermedad como causante de las mayores pérdidas económicas de peces cultivados marinos y de agua dulce (3).

Los primeros intentos para el control de la vibriosis en especies acuáticas, se realizaron antes de la Segunda Guerra Mundial, mediante el empleo extensivo de fármacos antimicrobianos como la penicilina y la estreptomycinina (3). Generalmente se administraban en el alimento y se asociaban con otras medidas profilácticas, como la higiene de la estanquería o el combate de parásitos y otros vectores transmisores de la enfermedad (1).

- a Recibido el 30 de noviembre de 1998 y aceptado para su publicación el 7 de diciembre de 1999.
- b Departamento de producción de especies no tradicionales. Area Producción Acuicola. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Coyoacán, D.F. 04510.
- c Laboratorio de Microbiología Acuática. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Coyoacán, D.F. 04510.
- d Departamento de Fisiología y Farmacología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Coyoacán, D.F. 04510.

Entre las distintas terapias contra la vibriosis se han empleado agentes quimioterapéuticos como la furazolidona, sulfonamidas, trimetoprim, así como antibióticos de amplio espectro, como ampicilina y tetraciclina (4), señalando los informes, casos de resistencia, así como de muy variada sensibilidad. También se han utilizado antisépticos como azul de metileno, verde de malaquita y otros; además de desarrollar agentes biológicos para inducir la inmunización natural (probióticas), o por medio de vacunas.

El grupo de las quinolonas, introducidas como agentes antibacterianos en 1964 con el ácido nalidíxico, conjuntamente con otras de primera generación como la flumequina y el ácido oxolínico, así como las quinolonas de segunda generación o fluoroquinolonas (ciprofloxacina, norfloxacina y ofloxacina, y más aún la enrofloxacin y danofloxacina), las cuales han mostrado alta eficacia contra gérmenes gram (-).

En peces y específicamente contra vibriosis, se han probado algunas quinolonas, pero ninguna cefalosporina (4), no obstante la alta eficacia bactericida y la baja toxicidad de estos agentes a bajas concentraciones.

Las quinolonas, en especial las de segunda generación, actúan eficazmente sobre gérmenes como *Escherichia coli*, *Proteus*, *Pseudomonas* y *Mycoplasmas*, por lo que resulta de importancia clínica la investigación de su actividad sobre *Vibrio*, en particular cuando se le une con una cefalosporina (5). Desde hace tiempo, se sabe que la sustitución de casi cualquier

radical en el grupo carboxílico en la posición 3 del núcleo quinolona, podría disminuir e incluso eliminar su actividad antibacteriana al reducir su afinidad por la enzima girasa A (topoisomerasa II) (6). Sin embargo, el acoplamiento exitoso de la molécula con el ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA), un precursor sin actividad antibacteriana, a un grupo carboxílico en la posición 3 del ácido 6-fluor-1-ciclopropil 7-(4 etil-1-piperazinil)-3-quinolin carboxílico, da origen a esta nueva molécula.

Esta molécula presenta un amplio espectro antibacteriano, además de esperar que produzca un efecto sinergista en casos clínicos inducidos de vibriosis en tilapia (7). En el presente trabajo se evalúa la efectividad de esta cefaquinolona (CQEPCA) en tilapias *Oreochromis mossambicus* infectadas experimentalmente con *Vibrio fluorens*, y se determinó la dosis efectiva 50% para evitar la mortalidad de los organismos, utilizando dos vías de administración (alimento y agua).

MATERIAL Y MÉTODOS

El *Vibrio fluorens* resistente, según API 20 (8), se obtuvo del cepario de colección del Laboratorio de Microbiología del Departamento del Hombre y su Ambiente, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

Antes de iniciar, se hicieron varias resiembras en infusión caldo-cerebrocorazón y agar bacteriológico, posteriormente se hicieron tinciones de gram (9) y se confirmó su presencia con el microscopio de contraste de fase.

Quinientas tilapias juveniles se utilizaron en esta investigación, con una talla entre 8-9 cm y un peso de 10 a 11 g y sin signos de enfermedad aparente, las cuales fueron donadas por el Departamento de Acuicultura de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Se utilizaron frascos de vidrio con capacidad de cuatro litros; en cada frasco se colocó un organismo con dos litros de agua declorada con tiosulfato de sodio (30 g/l solución madre) y se agregaron 0.3 ml de esta solución por litro de agua contenida en cada unidad de estudio. Los frascos con agua se airearon mediante una compresora regulada para alimentar 3 litros/min de aire; la temperatura del agua se mantuvo entre 18 y 21°C. El fin de mantener a cada organismo por separado, era para tener la seguridad de que cada pez tendría la dosis íntegra de las concentraciones del medicamento a estudiar.

La cefaquinolona (Laboratorios Aranda, S.A. de C.V.) se suministró en dos formas: 1) mezclada en el alimento, el cual fue preparado en el Departamento de Producción Acuícola, incorporando el medicamento al alimento ya fabricado a las concentraciones estudiadas; y 2) el medicamento en el agua, el cual fue diluido directamente en los frascos a las concentraciones estudiadas.

La concentración mezclada con el alimento, se basó en el trabajo de Elston et al. (10) y fueron: 1.0, 2.5, 5.0, 7.5 y 10 mg/kg. La concentración de cefaquinolona que se utilizó en el agua fue: 2, 5, 10, 15 y 20 mg/kg de peso corporal, es decir, el doble de la concentración utilizada en el

alimento; por cada forma de aplicación se hicieron cinco repeticiones y cada repetición estuvo constituida por 25 peces; los 125 organismos restantes fueron utilizados como control, manejados de la misma manera que los organismos expuestos al fármaco. La vía de infección bacteriana fue por medio de una inyección intramuscular de un inóculo de 1×10^5 en solución líquida de infusión caldo-cerebro-corazón, diluida en solución fisiológica de NaCl. Los primeros signos clínicos posinfección se observaron a las 24 horas y consistieron en oscurecimiento de la piel, hemorragia en la base de las aletas, boca y opérculo. Se hicieron muestreos bacteriológicos de cinco peces tomados al azar, a los cuales se les extrajo hígado, riñón y corazón y se sembró para comprobar la presencia de la bacteria.

A las 48 horas, las tilapias fueron medicadas de acuerdo al modelo usado por Hui *et al.* (11). La administración del medicamento en el agua se hizo una vez al día y a la misma hora. Cada repetición duró 4 días, de lunes a jueves y el viernes se esterilizó el agua en autoclave a 121°C/15 libras/15 minutos, para su desecho (12). En cinco organismos tomados al azar, de aquellos que no murieron, de todos los grupos tratados, se llevó a cabo la necropsia y se sembró a partir de hígado, riñón y corazón para comprobar la ausencia de *Vibrio fluorens*. Cinco grupos de cinco peces cada uno se utilizaron como control sin tratamiento.

El porcentaje de mortalidad de cada grupo se comparó por medio de análisis probit, y se obtuvieron los modelos ajustados de cada grupo (13).

Se determinó la potencia relativa (13) entre los tratamientos y se realizó una prueba de hipótesis para comparar el coeficiente de regresión de dichos modelos. Se llevó a cabo una prueba de Krushkal-Wallis y posteriormente se hicieron pruebas de U de Mann Whitney (14) entre pares de grupos, para probar las diferencias en la mortalidad entre los grupos tratados y los grupos control. Además, se utilizó un modelo lineal múltiple con el fin de obtener las pendientes de las concentraciones a estudiar, y probar la hipótesis entre la diferencia de las pendientes de los grupos. Para ello se realizó una prueba t de Student (15).

RESULTADOS

En los Cuadros 1 y 2 se muestran los porcentajes de mortalidad de los organismos medicados con el alimento y los medicados en el agua respectivamente. Las Figuras 1 y 2 muestran las mortalida-

des convertidas a probit. A partir de estos modelos, se calculó la potencia relativa entre ambos grupos para determinar la eficacia comparativa entre las dos formas de tratamiento, obteniéndose que la medicación en el alimento fue 1.9 veces más efectiva que la medicación en el agua.

Con el análisis probit correspondiente, se determinó que para el grupo medicado en el alimento, el 50% de los organismos sobrevivió con la dosis de 6.86 mg/kg, mientras que para el grupo medicado en el agua, la concentración efectiva 50% fue de 20.52 mg/kg (Cuadro 3).

En los grupos control sin tratamiento, la mortalidad fue mayor de 92%. La prueba de Krushkal-Wallis mostró diferencias significativas ($P < 0.01$) y las pruebas de U de Mann Whitney también ($P < 0.05$), excepto cuando se comparó la concentración de 1.0 mg en el alimento con el testigo y la concentración de 2.0, 5.0 y

Cuadro . Porcentaje de mortalidad en peces tratados con cefaquinolona administrada en el alimento.

DOSIS	REPETICIONES					TOTAL	% MORTALIDAD
	1	2	3	4	5		
1.0 mg/kg	5/5	5/5	4/5	4/5	5/5	23/25	92
0	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	25/25	100
2.5 mg/kg	4/5	3/5	4/5	5/5	4/5	20/25	80
0	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	25/25	100
5.0 mg/kg	3/5	4/5	3/5	3/5	4/5	17/25	68
0	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	25/25	100
7.5 mg/kg	3/5	2/5	3/5	2/5	1/5	11/25	44
0	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	25/25	100
10.0 mg/kg	2/5	1/5	3/5	2/5	1/5	9/25	36
0	5/5	5/5	4/5	4/5	5/5	23/25	92

Cuadro 2.- Porcentaje de mortalidad en peces tratados con cefaquinolona administrada en el agua.

DOSIS	REPETICIONES					TOTAL	% MORTALIDAD
	1	2	3	4	5		
2.0 mg/kg	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	24/25	96
0	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	25/25	100
5.5 mg/kg	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	24/25	96
0	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	25/25	100
10.0 mg/kg	5/5	4/5	5/5	4/5	3/5	21/25	84
0	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	25/25	100
15.0 mg/kg	4/5	3/5	3/5	2/5	3/5	15/25	60
0	5/5	5/5	4/5	5/5	4/5	23/25	100
20.0 mg/kg	3/5	2/5	3/5	3/5	1/5	12/25	48
0	5/5	4/5	4/5	4/5	4/5	21/25	92

10.0 mg en el agua contra el testigo (Figuras 1 y 2).

Las manifestaciones clínicas al infectar experimentalmente a la tilapia *Oreochromis mossambicus* con *Vibrio fluorens*, fueron en principio movimientos rápidos al nadar, a partir de 20 a 40 minutos sus movimientos disminuyeron; a las 24 horas postinóculo, se observó en algunos organismos oscurecimiento de la piel, mientras que en otros se presentó exoftalmia y hemorragias en las aletas, opérculo y branquias.

De los cinco grupos control muestreados se recuperó *Vibrio fluorens* en el total, y no se observó crecimiento de *Vibrio* en ninguno de los organismos tratados.

DISCUSION

Como se puede observar, la mortalidad fue menor en los organismos medicados

en el alimento, que en aquellos en los cuales el medicamento se suministró directamente en el agua, y en ambos casos, mucho menor que en los peces no tratados. El modelo lineal múltiple sustenta estos resultados, aceptándose la hipótesis alterna: las pendientes de las mortalidades de los grupos son distintas entre sí con una probabilidad de 0.001 y una confiabilidad del 95% (13). En las Figuras 1 y 2 se muestra mayor mortalidad en los organismos que fueron medicados en el alimento; esto significa, que se requiere una mayor concentración del medicamento en el agua; sin embargo, podría haber variaciones de acuerdo con la patogenicidad del agente. Los resultados obtenidos, son comparables con los de otros investigadores utilizando a la enrofloxacin, aunque no específicamente en tilapia, ya que el modelo utilizado en la mayoría de los trabajos ha sido la trucha, organismo que es atacado por *Aeromonas*, que producen

Figura 1.- Porcentaje de mortalidad convertida a Probit en tilapia medicada en el alimento.

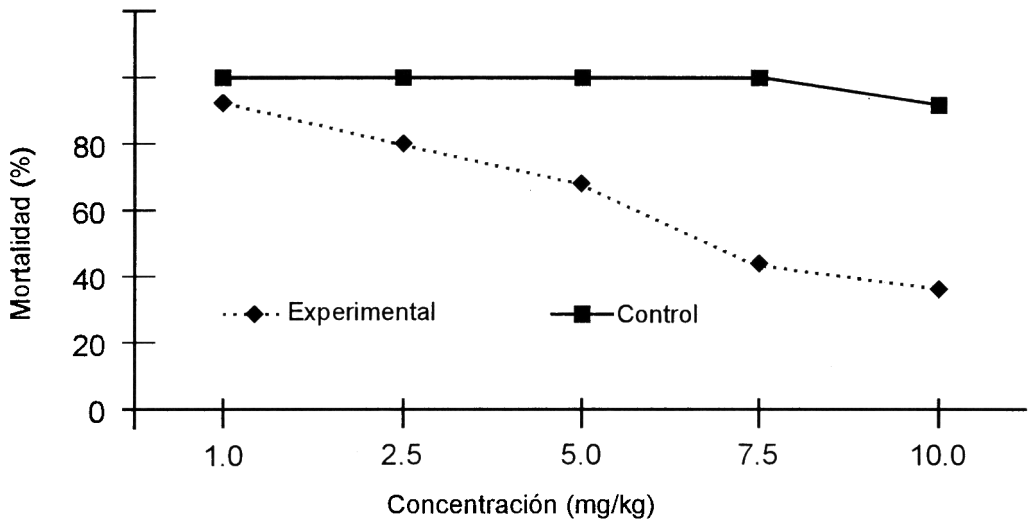
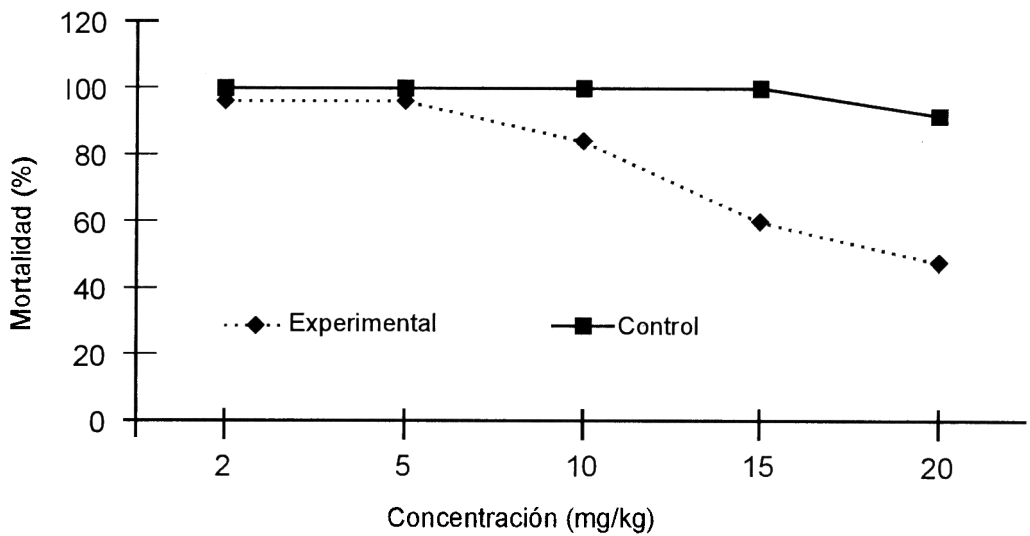


Figura 2.- Porcentaje de mortalidad convertida a Probit en tilapia medicada en el agua.



los mismos signos que el *Vibrio*. No se encontraron trabajos con cefalosporinas en peces.

La mortalidad obtenida en este ensayo, fue menor que la señalada en otros trabajos realizados con organismos acuáticos, como es el caso de la trucha (16). Las lesiones encontradas probaron que el agente fue lo suficientemente patógeno como para afectar los órganos externos e internos; estas lesiones son comparables con las descritas en la bibliografía. Posteriormente el *Vibrio fluorens* se aisló de hígado, riñón y corazón de los organismos sacrificados (17,18).

De acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio, se concluye que la concentración óptima del medicamento para proteger al 50% de los organismos fue de 6.85 mg/kg

en el alimento y de 20.52 mg/kg en el agua, y que la mejor forma de administración del medicamento fue en el alimento, ya que por esta vía, la cefaquinolona fue 1.9 veces más efectiva que cuando se administró en el agua.

La relevancia de este trabajo radica en que el fármaco, es el primer producto antibacteriano de síntesis de origen nacional, el cual ha mostrado una gran efectividad contra *Vibrio fluorens*; dado que hay pocos productos aceptados para su utilización en el área acuícola y la resistencia de las bacterias a éstos es notable, esta molécula representa una alternativa para el control de gérmenes gram negativos. Sin embargo, considerando que es un producto en fase experimental, no se tiene aún el costo real a escalas industriales.

Cuadro 3. Datos obtenidos mediante la aplicación del análisis probit.

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

* En el alimento.

log Dosis = 3.5682 - 0.54645 (probit)
 DL50 = antilog (log dosis/probit 5)
 = antilog [log dosis/3.5682 - 0.54645 (5)]
 = 10^{0.8359}
 = 6.8538 mg/kg

** En el agua.

log Dosis = 3.5323 - 0.04440 (probit)
 DL50 = antilog (log/probit 5)
 = antilog[log dosis/3.5323 - 0.04440 (5)]
 = 10^{1.3123}
 = 20.52 mg/kg.

BACTERICIDAL EFFECT OF CEPHAQUINOLONE AGAINST *Vibrio fluorens* IN TILAPIA (*Oreochromis mossambicus*).

ABSTRACT

García RM, Romero JJ, Ocampo CL, Auró OA. *Téc Pecu Mex* 1999;37(3)23-30. One of the main problems that greatly affects aquaculture, both in fresh and salt water, is the presence of pathogenic organisms such as the *Vibrionaceae* family. *Vibrio fluorens* produces in fish bleeding at the base of the fins, mouth and branquiae, and inflammation and necrosis of skin and muscle. When fish survive the infection, scar tissue remains reducing the market value. In this bioassay, the activity of a new cephaquinolone was evaluated in experimentally infected tilapia. This antibiotic is the result of the joining through a carboxile bonding of a fluoroquinolone with a cephalosporine, thus providing a wider spectrum of activity. This cephaquinolone was administered at different concentrations in the water and also mixed with the food. It was observed that when the antibiotic was added, mortality decreased. The effective 50% dose in food was 6.6 mg/kg while in water it was 20.5 mg/kg. Effectiveness, of the drug proved to be 1.9 times greater in food than in water.

KEY WORDS: Cephaquinolone, Tilapia, *Vibrio fluorens*, Aquaculture.

LITERATURA CITADA

1. Reichenbach HH. *Enfermedades de los peces*. 1a ed. España: Acribia; 1982.
2. McNeill SJ. *Sea Microbes*, 1a ed. USA: Oxford University Press; 1979.
3. Inglis V, Roberts JR, Bromage NR. *Bacterial diseases of fish*. 1a ed. USA: John Wiley & sons; 1993.
4. Bailey EJ, Finegold SM. *Bailey and Scott's diagnostic microbiology*. 8th ed. USA: The CV Mosby Co.; 1990.
5. Brander CG, Pugh MD, Bywater JR, Jenkins WL. *Veterinary applied pharmacology and therapeutics*. 5th ed. London (UK): Bailliere Tindall; 1991.
6. Vancusten JG, Babish, Schwark WS. The fluoroquinolone antimicrobials: activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animals and toxicity. *Cornell Vet* 1990;(80):73-79.
7. Sumano LH, Ocampo CL, Azuara J. Antibacterial activity, pharmacokinetics and therapeutic efficacy in poultry of a new cephalosporin-fluoroquinolone (CQ) molecule. *J Appl Anim Res* 1998;(13):1-3.
8. *Analytical profile system*. API 20 editores. USA: Sherwood Medical; 1986.
9. Beishir L. *Microbiology in practice* 2nd ed. Canfield (UK): Canfield Press; 1977.
10. Elston R, Drum AS, Bunnell PR. Efficacy of orally administered difloxine for the treatment of furunculosis in Atlantic salmon held in seawater. *Aquatic Anim Health* 1995;7(1)22-28.
11. Hui MH, Gregory AW, Bowse RP. Efficacy of enrofloxacin for the treatment of salmonids with bacterial kidney disease, caused by *Renibacterium salmoninarum*. *Aquatic Anim Health* 1994;(6):220-223.
12. Apha. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 18th ed. USA: American Public Health Association. 1989.
13. Liman OR. *An introduction to statistical method and data analysis*. 4th ed. London: Duxbury Press; 1993.
14. Siegel S. *Estadística no paramétrica*. 2a ed. México, D.F.: Trillas; 1972.
15. Méndez RJ, Namihisa GD, Moreno AL, Rosa MC. *El protocolo de investigación*. 2a ed. México, D. F.: Trillas; 1998.
16. Paul RB, Gregory AW, Hui MH. Laboratory efficacy of enrofloxacin for the control of *Aeromonas salmonicida* infection in rainbow trout. *Aquatic Anim Health* 1994(6):288-291.
17. Ahmed SM, Shoreit AMM. Vibriosis in tilapia species at Assiut Governorate (Egypt). *Assiut Vet Med* 1994;226-231.
18. Espinosa JM, Labarta V. *Patología en acuicultura*. Investigación Técnica Científica. Santiago de Compostela, España: Barjan, 1988:125.