

# Estudio molecular e histopatológico de la infección por *Citrobacter freundii* y *Edwardsiella tarda* en reproductoras de rana toro (*Rana catesbeiana*)

## Molecular and histopathological study of *Citrobacter freundii* and *Edwardsiella tarda* infection in bullfrog (*Rana catesbeiana*) broodstock

María Soledad Morales-Covarrubias<sup>1\*</sup> , Blanca Alicia Ramírez-Azpilcueta<sup>1</sup> , María del Carmen Bolán-Mejía<sup>1</sup> , Julissa Enciso-Ibarra<sup>1</sup> ,  
Frida Stephania Silva-Alonso<sup>2</sup> , Bruno Gómez-Gil<sup>1</sup> , Noemí García-Aguilar<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo en Acuicultura y Manejo Ambiental. Mazatlán, Sinaloa, México.

<sup>2</sup>Universidad Tecnológica de Guadalajara. Colonia La Aurora, Guadalajara, Jalisco.

\*Corresponding author: [marisol@ciad.mx](mailto:marisol@ciad.mx)

### RESUMEN

Las enfermedades bacterianas son responsables de grandes pérdidas económicas en la acuicultura en todo el mundo, y las ranas son susceptibles a las bacterias Gram negativas causantes de la septicemia. Este estudio registra las características bioquímicas, moleculares y patológicas de la infección por *Citrobacter freundii* y *Edwardsiella tarda* en hembras reproductoras de rana toro (*Rana catesbeiana*). Para el diagnóstico bacteriológico se utilizaron reproductoras clínicamente enfermas con letargo, anorexia, piel pálida, lesiones macroscópicas de hemorragia en patas traseras, distensión abdominal y parte superior de las ancas. Se obtuvieron dos aislados bacterianos de hígado, se caracterizaron como bacilos Gram negativos, catalasa positivos y oxidasa negativos. Se realizó un ensayo experimental para confirmar los postulados de Koch. Los aislados de hígado del bioensayo (postulados de Koch), RcM1 (*R. catesbeiana* Muestra 1) y RcM2 (*R. catesbeiana* Muestra 2) fueron sometidos a identificación bioquímica mediante un API comercial 20E y molecular, utilizando la secuenciación del genoma completo. Las muestras presentaron perfil bioquímico y molecular correspondiente a *C. freundii* y *E. tarda*. Por histopatología de los organismos iniciales y del experimento presentaron severa infiltración de eritrocitos, trombocitos, formación de nódulos con aglomerados bacterianos en el centro, infiltración de fibroblastos rodeando al nódulo, manchas negras, (melanocitos) multifocal, necrosis multifocal y pérdida de la estructura original en riñón, bazo, hígado e intestino.

**Palabras clave:** Ranicultura; reproductoras; distensión abdominal; hemorragia

### ABSTRACT

Bacterial diseases are responsible for the majority of global economic losses in aquaculture production worldwide, and frogs are susceptible to Gram-negative bacteria that cause septicemia. This study records the biochemical and molecular characteristics and pathological effects of *Citrobacter freundii* and *Edwardsiella tarda* infection in breeding female bullfrogs (*Rana catesbeiana*). For the bacteriological diagnosis, clinically ill breeders with lethargy, anorexia, pale skin, macroscopic hemorrhage lesions on the hind legs, abdominal distension and upper part of the haunches were used. Two bacterial isolates were obtained from the liver, they were characterized as Gram negative, catalase positive and oxidase negative bacilli. An experimental test was carried out Koch's postulates to confirm. The liver isolates from the bioassay (Koch's postulates), RcM1 (*R. catesbeiana* Muestra 1) and RcM2 (*R. catesbeiana* Muestra 2) were subjected to biochemical identification by a commercial API 20E and molecular using whole genome sequencing. The samples presented a biochemical and molecular profile corresponding to *C. freundii* and *E. tarda*. histopathology analysis of the initial organisms and the experiment, they showed severe infiltration of erythrocytes, thrombocytes, formation of nodules with bacterial agglomerates in the center, infiltration of fibroblasts surrounding the nodule, multifocal black spots (melanocytes), multifocal necrosis and loss of normal structure in bullfrogs internal organs, such as the liver, kidney, spleen and intestine.

**Key words:** Frog farming; broodstock; abdominal distension; hemorrhage

## INTRODUCCIÓN

El género *Citrobacter* está formado por bacterias gramnegativas, aeróbicas facultativas, con forma de bastón y no formadoras de esporas que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* [1]. Se pueden encontrar abundantemente en los recursos hídricos naturales, aguas residuales, suelo, alimentos en polvo, muestras de orina y materia fecal [2, 3]. Se han reportado un total de 19 especies de *Citrobacter*. Entre las diferentes especies de *Citrobacter*, *C. freundii* tiene cepas patógenas para animales y humano. Se han documentado infecciones por *C. freundii* en animales terrestres domésticos, cautivos y salvajes, anfibios, diversas especies de tortugas, mamíferos acuáticos y peces de piscifactoría [1]. *C. freundii* normalmente se considera un patógeno oportunista en peces, actuando como un invasor secundario. En condiciones adversas como estrés ambiental o inmunodeficiencia, puede ser un patógeno primario [4].

*Edwardsiella tarda*, bacteria gramnegativa, anaerobia facultativa y móvil por flagelación peritrica, causa infecciones intestinales y extraintestinales. Se encuentra en aguas dulces y marinas. La vía de transmisión puede ser directamente el agua o a través de la ingestión de animales acuáticos mal cocinados. La virulencia de esta bacteria está ligada a la producción de hemolisinas y su habilidad para invadir las células del intestino. *E. tarda*, ha sido reportada como causante de alta mortalidad en el pez Oscar (*Astronotus ocellatus*) con alteraciones en hígado y bazo [5].

La acuicultura es actualmente uno de los sectores de producción de alimentos de más rápido crecimiento en el mundo y se ha consolidado como un recurso para apoyar la seguridad nutricional de miles de millones de personas mediante el complemento de la fuente de proteína animal. En México, la producción intensiva de rana toro es una de las actividades acuícolas que ha tomado mayor relevancia, debido a su creciente demanda interna y a la exportación de animales destinados al mercado gourmet (alimentación), investigación y docencia [6].

En la Sierra Central Mexicana (Aguascalientes, Querétaro, Jalisco y Zacatecas), la producción exportable de rana toro en 2015 fue de 20 toneladas, mientras que en 2016 y 2017 la producción aumentó de 23,5 a 26 toneladas, respectivamente [7].

Las ranas pueden convertirse en hospedadores intermedios o definitivos de diversas especies de bacterias, los cuales están estrechamente relacionados con su dieta, hábitat, sistema de producción, bioseguridad y número de individuos [8]. Las bacterias pueden afectar negativamente el desarrollo y la salud de los animales [9, 10]. Sin embargo, a pesar de la aparición común de bacterias en anfibios, existen pocos estudios que indiquen su prevalencia y distribución [9, 11]. Además, los productores acuícolas de rana toro han establecido diversas estrategias para su cría, estableciendo principalmente unidades de producción intensivas con alta concentración de animales; donde se controla el crecimiento, la reproducción, la temperatura y el ambiente con el fin de mejorar los parámetros productivos [7] y con ello el aumento de enfermedades.

Debido a la importancia que está adquiriendo la ranicultura para obtención de carne, así como también las mortalidades presentadas con signología recurrente en reproductoras, acompañado en algunas ocasiones con variaciones de temperatura ambiental en el ranario CIAD-Mazatlán en mayo del 2021, el objetivo de este estudio fue identificar los agentes causales de las mortalidades presentadas en reproductoras de *Rana catesbeiana*.

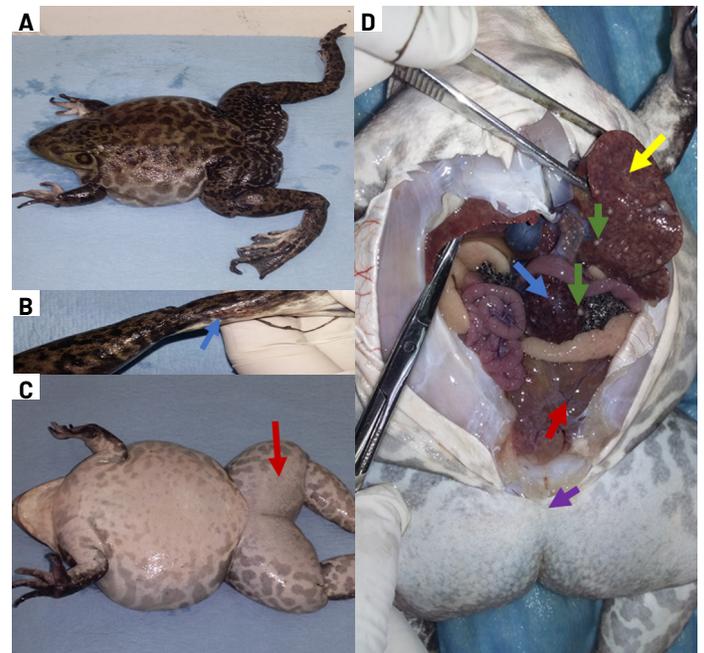
## MATERIAL Y MÉTODOS

### Declaración de ética

El manejo de los organismos se realizó siguiendo el Manual de buenas Prácticas de Producción Acuícola de rana toro de Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria 02 de noviembre de 2016 [12].

### Toma de muestras y aislados bacterianos

Se recolectaron cinco hembras de rana toro, con un peso promedio de  $512 \pm 4$  g (Báscula-BOECO-27054141-made in USA) por cada muestreo (abril del 2016 y mayo del 2021), de la sala de reproductores del CIAD-Mazatlán que presentaban letargo, anorexia, piel pálida, lesiones macroscópicas de hemorragia en patas traseras (FIG. 1), expansión en abdomen y parte superior de las ancas. Al realizar la disección, se observó líquido ascítico en región abdominal, hígado, bazo e intestino inflamado con nódulos blanquecinos multifocal (FIG. 1). Los especímenes fueron sacrificados con un golpe seco en el área anterodorsal [12] para luego realizar la disección asépticamente de hígado, bazo, riñón e intestino, tomando muestras para bacteriología, análisis metagenómico e histopatología.



**FIGURA 1. A:** Rana toro (*Rana catesbeiana*) con piel pálida. **B:** Lesiones macroscópicas de hemorragia en patas traseras (flecha azul). **C:** Expansión en abdomen y parte superior de las ancas (flecha roja). **D:** Presencia de líquido ascítico (flecha lila) en la región abdominal al realizar la disección. Inflamación en intestino (flecha roja), hígado (flecha-amarilla) y bazo (flecha-azul) con presencia de nódulos blanquecinos (flechas verdes) solo en hígado y bazo de distribución multifocal

### Bacteriología

Se tomaron 0,5 g de hígado, intestino, bazo y riñón, para ser homogeneizadas en 1,0 mL de agua estéril. Se realizaron tres diluciones con suero fisiológico y se sembró 0,1mL en TSA (Agar

tripticosa soya– Difco, BD) y Agar sangre por período de incubación de 24 h a 30°C (VWR Scientific, 1565, USA).

Para el aislamiento de bacterias, se tomaron muestras de colonias aisladas y fueron sembradas en TSA incubándose a 30°C (VWR Scientific, 1565, USA) durante 24 h. Una vez obtenidos los aislados fueron sometidos a tinción de Gram, prueba de oxidasa y catalasa e identificación bioquímica mediante un kit comercial API 20E (BioMérieux, Francia), de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Para análisis posteriores las muestras purificadas fueron conservadas a -80°C (Panasonic-U53VA-PA, USA) en crioviales con caldo tripticosa soya (Difco, BD) y 10 % de glicerol (PROMEGA).

### Inoculo bacteriano

La suspensión bacteriana se realizó tomando un inóculo de cada cepa y resuspendiéndola en suero fisiológico estéril (NaCl al 0,85 %). Las suspensiones bacterianas se ajustaron a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, equivalente a 0,5 del estándar MacFarland [13]. Para conocer la concentración real del inóculo se hicieron 6 diluciones y se sembraron las 2 últimas en TSA. Para el bioensayo experimental se tomaron 50 µL de la suspensión stock y se resuspendieron en 2 mL de suero fisiológico, de esa dilución se inyectaron a las ranas 300 µL por vía intramuscular.

### Extracción de ADN

Se utilizó el kit Promega (Wizard Genomic DNA Purification Kit) para extraer el ADN genómico de los aislados bacterianos siguiendo la metodología descrita por el fabricante, tomando pequeños trozos (0,5 g) para realizar el macerado de hígado, intestino, bazo y riñón. Para verificar la calidad e integridad del ADN se recurrió a la técnica de la reacción en cadena de polimerasa conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), utilizando los oligos 18SrRNA-F 5'-GTTAATTCCAGCTCCAATAGCGTA-3' y 18SrRNA-R 5'-GAACTACGACGGTATCTGATCGTC-3' que amplifican la subunidad 18S-ribosomal con un producto final de 457 pb. Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo a 94°C, 5 min; 35 ciclos a 94°C 1 min; 57°C, 1 min y 72°C, 1 min. El análisis de los fragmentos de ADN se realizó en un gel de agarosa al 2 % en buffer tris-acetato (TAE) en una cámara de electroforesis (ENDURO LABNET, ENDURO 10,10, USA) con voltaje de 88 por 30 min. Su pureza y cantidad se comprobaron midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm con un espectrofotómetro DS-11 Fx (DeNovix, DS-11, USA).

### Secuenciación de los aislados bacterianos

Las secuencias de las cepas RcM1 y RcM2 se obtuvieron con la plataforma ILumina Miniseq (ILUMINA, Miniseq, USA) en una celda de flujo de salida media (300 ciclos, 2 × 150 bp). Las bibliotecas de ADN genómico se prepararon utilizando el kit de preparación de bibliotecas Nextera®XT, mediante una única reacción enzimática de "Tagmentación", se cuantificaron con el kit de ensayo de cuantificación de dsDNA (Invitrogen by life technologies, Qubit 2,0, USA) de alta sensibilidad para el fluorómetro Qubit (Qubit 2 fluorometer, USA) y se preparó un conjunto equimolar. Este conjunto se cuantificó con el ensayo HS para el Qubit y se ajustó a 4 nM para una mayor desnaturalización, dilución a 1 pM.

### Análisis histopatológico

Las muestras de hígado, intestino, bazo y riñón fueron fijadas por inyección e inmersión en solución Davidson [14] por 36 h. Después

del proceso de fijación se sumergieron en etanol al 70 % para su preservación. Las muestras se deshidrataron e impregnaron en parafina de acuerdo con la metodología de rutina de Bell y Lightner [15]. Una vez incluida la parafina en los tejidos se elaboraron los bloques de parafina empleando el embebedor (Leica® modelo histoembedder) para cortar las muestras a 4 µm utilizando un micrótopo manual (Thermo Scientific, Hm325, China). Las muestras fueron teñidas con hematoxilina & eosina-floxina (H&E) y examinadas para detectar alteraciones en órganos y tejidos utilizando el microscopio óptico (Olympus, BX60, USA) con cámara digital (Infinity 2) para documentación.

### Confirmación de virulencia bacteriana y postulados de Koch

Para cumplir los postulados de Koch, las bacterias aisladas (RcM1 y RcM2) de los organismos enfermos fueron inyectadas en forma individual y combinada, intramuscularmente en ranas toro sanas, con 200 µL de cada bacteria para tener 400 µL  $1 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias (UFC·mL<sup>-1</sup>). Se utilizaron un total de 5 ranas sanas para el desafío de bacteria individual y 10 ranas sanas para la mezcla de bacterias con un peso de  $412 \pm 0,3$  g. Después del desafío, las ranas fueron monitoreadas cinco veces al día para detectar la presencia de signos clínicos y/o mortalidad durante un período de 5 días. Se realizaron disecciones a las ranas clínicamente enfermas y se tomaron muestras de hígado, riñón, bazo e intestino para análisis de bacteriología, histopatología y molecular. Durante el estudio la calidad del agua se mantuvo dentro de los parámetros establecidos para la rana toro (*Rana catesbeiana*) en producción intensiva [12], temperatura  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , Oxígeno Disuelto  $6,0 \pm 1$  ppm, Alcalinidad Total 100 (mg·L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>), Dureza Total 100 mg·L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>, Nitratos 0 mg·L<sup>-1</sup>, Nitritos 0 mg·L<sup>-1</sup> y Amoniaco <0,10 mg·L<sup>-1</sup>. Los parámetros fisicoquímicos evaluados se tomaron con multi sonda (556 MPS, YSI, EUA), la dureza (mg·L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>) y alcalinidad (mg·L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>) fueron tomadas con el kit de pruebas (FF-1A, HACH, Alemania), utilizando la metodología del fabricante.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Bacteriología

La recuperación de las dos bacterias fue obtenida de hígado de ranas clínicamente enfermas del bioensayo de mezcla (confirmación de virulencia y postulados de Koch), se caracterizaron por ser en la muestra RcM1 bacilos Gram negativos de colonia plana con núcleo definido, color blanco opaco, borde circular definido transparente que bioquímicamente fue identificada como *Citrobacter freundii* con 100 % de probabilidad y para la muestra RcM2 Cocobacilos Gram negativos de colonia plana, color beige sin núcleo, borde circular definido transparente identificada como *Edwardsiella tarda* con 100 % de probabilidad (TABLA I).

### Secuenciación de los aislados bacterianos

Se obtuvieron suficientes secuencias limpias para ensamblar genomas de buena calidad (TABLA II). La identificación de las cepas fue superior al 99 % de promedio de identidad en nucleótidos (ANI, por sus siglas en inglés) con cepas referencia de las especies.

### Análisis histopatológico

Las muestras tomadas de los organismos clínicamente enfermos de la sala de reproductores del ranario del CIAD y de la infección experimental, presentaron por histopatología alteración en órganos

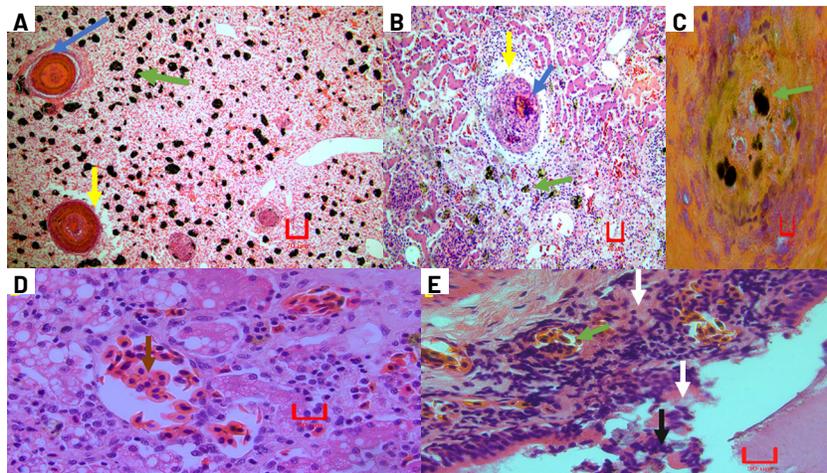
**TABLA I**  
**Caracterización bioquímica mediante el Sistema API 20 E de la bacteria *Citrobacter freundii* (RcM1) y *Edwardsiella tarda* (RcM2) aisladas de reproductoras de rana toro (*Rana catesbeiana*)**

Pruebas	Abreviatura	RcM1 <i>C. freundii</i>	RcM2 <i>E. tarda</i>
Oxidasa	OX	-	-
Catalasa	CAT	+	+
Betagalactosidasa	OPNG	+	-
Arginina dihidrolasa	ADH	+	-
Descarboxilación de lisina	LDC	-	+
Descarboxilación de ornitina	ODC	-	+
Citrato	CIT	+	-
<b>Producción de hidrógeno:</b>			
Sulfurado	H <sub>2</sub> S	+	-
Ureasa	URE	+	-
Desanimación del triptófano	TDA	+	-
Producción de indol	IND	+	-
Voges Proskauer	VP	-	-
Gelatinasa	GEL	+	-
<b>Producción de ácido:</b>			
Glucosa	GLU	+	+
Manitol	MAN	-	-
Inositol	INO	+	-
Sorbitol	SOR	+	-
Rhamnosa	RHA	-	-
Sacarosa	SAC	+	-
Melobiosa	MEL	+	-
Amigdalina	AMY	+	-
Arabinosa	ARA	+	-

y tejidos: Hígado, macrófagos pigmentados multifocal de color marrón oscuro y necrosis multifocal. Bazo, formación de nódulos y aglomerados bacterianos en el centro, infiltración de fibroblastos rodeando al nódulo, macrófagos pigmentados multifocal de color amarillo verdoso y necrosis multifocal. Riñón, necrosis multifocal e infiltración células sanguíneas. Intestino, necrosis multifocal y pérdida de la estructura original, mucosa y epitelio con desprendimiento celular y necrosada con macrófagos pigmentados multifocal de color amarillo dorado (FIG. 2).

**TABLA II**  
**Características de los genomas obtenidos**

Características	RcM1 <i>C. freundii</i>	RcM2 <i>E. tarda</i>
Número de secuencias limpias	3.359.164	4.526.498
Contigs	79	154
N <sub>50</sub> (Mpb)	215.766	45.007
Tamaño genoma (Mpb)	5,36	3,59
Cobertura (X)	57,4	113,7
Completeness (%)	100	100
Contamination (%)	0,25	0,35
GC (%)	51,44	57,45
<b>ANI (%)</b>	<b>99,34</b>	<b>99,22</b>
Núm. Genes (CDS)	5.410	3.488
Núm. RNAs	89	104
Num. Acceso NCBI		



**FIGURA 2.** Cortes histológicos de órganos y tejidos de Rana toro (*Rana catesbeiana*) donde se observa; A: Hígado con severa infiltración de eritrocitos, trombocitos, formación de nódulos (flecha azul) con aglomerados bacterianos en el centro, infiltración de fibroblastos rodeando al nódulo, macrófagos pigmentados multifocal de color marrón oscuro (flecha verde) y necrosis multifocal (flecha amarilla). B: Bazo, presencia formación de nódulos (flecha amarilla), aglomerados bacterianos en el centro (flecha azul), infiltración de fibroblastos rodeando al nódulo. C: Bazo con macrófagos pigmentados multifocal de color amarillo verdoso oscuro (flecha verde) y necrosis multifocal. D: En Riñón, se aprecia necrosis multifocal e infiltración células sanguíneas (flecha café). E: Intestino con necrosis multifocal y pérdida de la estructura original (flecha blanca), mucosa y epitelio con desprendimiento celular y necrosada (flecha negra) y macrófagos pigmentados multifocal de color amarillo dorado (flecha verde). Tinción Hematoxilina-Eosina

## Confirmación de virulencia bacteriana y postulados de Koch

Las ranas inyectadas de manera individual con las bacterias RcM1 y RcM2 mostraron a las 45 h post infección letargo, anorexia y piel pálida, para ambas bacterias; a las 100 h se inició la expansión abdominal (hidropesía) con la bacteria RcM1 y a las 110 h con la bacteria RcM2; las lesiones macroscópicas en patas traseras se presentaron a las 112 h solo para RcM2; y por último, la mortalidad para ambas inicio a las 115 h.

En los organismos con mezcla de bacterias las características externas y lesiones observadas en las reproductoras con mortalidad atípica en la sala de reproducción CIAD, se observaron en los organismos clínicamente enfermos a las 70 h y la mortalidad inicio a las 72 h, seleccionando los organismos clínicamente enfermos para los análisis de bacteriología, molecular e histopatología.

No hay estudios previos que describan la coinfección por *C. freundii* y *E. tarda* en rana toro, es la primera descripción de una coinfección de estas dos bacterias causantes de lesiones microscópicas en órganos y tejidos como hígado, bazo, riñón intestino y muerte en rana toro.

Se ha reportado que en animales estresados por confinamiento y alteración de parámetros ambientales, es más probable que se detecten bacterias potencialmente patógenas que en organismos sanos y en libertad [16]. Los efectos del cautiverio y temperatura alta pueden ser factores potenciales para desencadenar la coinfección bacteriana oportunista observada en la rana toro. Las alteraciones observadas por histopatología en intestino probablemente se deban a *C. freundii*, ya que ha sido reportada en peces y aves que penetra la mucosa intestinal, desencadenando bacteriemia [17].

Las patologías reportadas en este trabajo, en hígado, riñón, bazo y lesiones en piel probablemente se deban a *E. tarda* ya esta bacteria puede adherirse y penetrar en las células epiteliales [18, 19, 20, 21]. La capacidad de *E. tarda* para invadir células HeLa (una línea de células epiteliales obtenida a partir de un carcinoma humano) y producir  $\beta$ -hemolisina sugiere que las patologías invasivas observadas en especies de peces cultivadas pueden estar relacionadas con esta propiedad [20] y probablemente pueda estar relacionada con las patologías encontradas en las reproductoras rana toro de esta investigación.

En la mayoría de las bacterias patógenas invasivas se ha comprobado que el aumento de la concentración de hierro en el hospedador implica una mayor susceptibilidad a la infección [22]. Esto hace que la capacidad de captación de este elemento constituya uno de los principales factores de virulencia de los microorganismos patógenos. Hasta la actualidad, se conoce poco sobre los mecanismos de captación de hierro de *E. tarda*. Kokubo y cols. [22] y Dhaenens y cols. [23] publicaron que *E. tarda* posee un sistema de captación de hierro mediado por sideróforos el cual es necesario para su supervivencia dentro del hospedador.

En peces inoculados con *E. tarda*, se han reportado lesiones de septicemia, como: hiperemia con congestión sanguínea de aletas, con hemorragias petequiales en diferentes partes del cuerpo. Internamente con hiperemia general del peritoneo, hígado moteado y con edemas [24], lo cual está acorde con lo observado en el presente trabajo. En el bazo de los organismos, la presencia de nódulos blanquecinos de distribución multifocal fue similar a lo descrito por Rondón et al. [25] quienes demostraron el desarrollo de lesiones similares en infecciones naturales por *E. tarda*. De la misma manera, Muroga [26] ha reportado la presencia de puntos blancos similares a granulomas, que contienen grupos de bacterias con fagocitos alterados y cubiertos por tejido fibroso que se desarrollan en el bazo y riñón en *Yellowtail* infectados experimentalmente con *Pasteurella piscicida*.

## CONCLUSIONES

Este es el primer reporte de *Citrobacter freundii* y *Edwardsiella tarda* en reproductoras de rana toro (*Rana catesbeiana*). La enfermedad se caracterizó por daños en órganos y tejidos vitales causando alta mortalidad en pocos días. Los aislados son bacterias oportunistas que causan mortalidades cuando los organismos se encuentran estresados lo que representa importancia clínica no sólo para el cultivo de ranas, sino también por el riesgo de circulación entre diferentes huéspedes.

## Conflicto de Intereses

Los autores declaran la no existencia de conflictos en el presente trabajo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Churria-Gornatti CD, Arias N, Origlia J, Netri C, Marcantoni H, Piscopo M, Herrero-Loyola M, Petruccelli M. *Citrobacter freundii* infection in two captive Australian King parrots (*Alisterus scapularis*). JZAR [Internet]. 2014; 2(2):52-53. doi: <https://doi.org/g8w2sv>
- [2] Borenshtein D, Schauer DB. The Genus *Citrobacter*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, editors. The Prokaryotes [Internet]. New York (NY, EUA): Springer; 2006. p. 90-98. doi: <https://doi.org/dj3cjp>
- [3] Fernández-Fernández FJ, Puerta-Louro R, Rodríguez-Conde I, de la Fuente-Aguado J. Absceso epidural por *Pasteurella pneumotropica*. Enferm. Infecc. Microbiol. Clín. [Internet]. 2011; 29(8):631-638. doi: <https://doi.org/dn9f4f>
- [4] Jeremić S, Jakić-Dimić D, Veljović L. *Citrobacter freundii* as a cause of disease in fish. Acta Vet. [Internet]. 2003; 53(5-6):399-410. doi: <https://doi.org/ff8wvp>
- [5] Vishnupriya V, Raja-Swaminathan T, Dharmarathnam A, Sharma KSR, Geetha PR. Investigation of mass mortality caused by multidrug resistant *Edwardsiella tarda* in Oscar fish, *Astronotus ocellatus* from an ornamental fish farm, Kerala. (Preprint) Res. Sq. [Internet]. 2023; PPR765485. doi: <https://doi.org/g8w2sw>
- [6] Platas-Rosado DE, Vilaboa-Arroniz J. La acuicultura mexicana: potencialidad, retos y áreas de oportunidad. Rev. Mexicana Agroneg. [Internet]. 2014 [consultado 12 Jul. 2024]; 35:1065-1071. Disponible en: <https://goo.su/zrZU1T>
- [7] Islas-Ojeda E, García-Munguía A, Chávez-González L, López-Gutiérrez M, Hernández-Valdivia E, García-Munguía C. Producción sostenible de rana toro (*Lithobates catesbeianus*) con agua de reúso de un sistema Biofloc. Abanico Vet. [Internet]. 2021; 11:1-15. doi: <https://doi.org/g8w2sx>
- [8] Pessier AP, Mendelson JR 3<sup>rd</sup>, editors. A manual for control of infectious diseases in amphibian survival assurance colonies and reintroduction programs, Ver. 2.0. Apple Valley (MN, EUA). 2017; IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group. 240 p.
- [9] Schadich E, Cole ALJ. Pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* to brown tree frogs (*Litoria ewingii*). Comp. Med. [Internet]. 2010 [consultado 12 Jul. 2024]; 60(2):114-117. PMID: 20412685. Disponible en: <https://goo.su/BQzTGx>

- [10] Juan-Sallés C, Almagro V, Carbonell L, Valls X, Montesinos A, Fernández-Bellón H. Enfermedades infecciosas y parasitarias en anfibios en cautividad: estudio retrospectivo de 131 pacientes. *Clin. Vet. Peq. Anim.* [Internet]. 2020 [consultado 30 May. 2024]; 40(1):15-27. Disponible en: <https://goo.su/yLtJUFX>
- [11] Trimpert J, Eichhorn I, Vladimirova D, Haake A, Schink AK, Klopfleisch R, Lübke-Becker A. *Elizabethkingia miricola* infection in multiple anuran species. *Transbound. Emerg. Dis.* [Internet]. 2021; 68(2):931-940. doi: <https://doi.org/g8w2sz>
- [12] Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). Manual de buenas prácticas de producción acuícola de Rana Toro [Internet]. Ciudad de México: Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria; 2016 [consultado 12 Jul. 2024]. 80 p. Disponible en: <https://goo.su/3XUNU2q>
- [13] McFarland J. The nephelometer: an instrument for media used for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *JAMA* [Internet]. 1907; 49(14):1176-1178. doi: <https://doi.org/csdkhx>
- [14] Lightner D. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. Baton Rouge (LA, EUA): World Aquaculture Society; 2001. 256 p.
- [15] Bell TA, Lightner DV. A handbook of normal penaeid shrimp histology. Baton Rouge (LA, EUA): World Aquaculture Society; 1988. 114 p.
- [16] Steele C, Rapaka RR, Metz A, Pop SM, Williams DL, Gordon S, Kolls JK, Brown GD. The beta-glucan receptor Dectin-1 recognizes specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog.* [Internet]. 2005; 1(4):e42. doi: <https://doi.org/d5645j>
- [17] Godoy SN, Matushima ER. A survey of diseases in passeriform birds obtained from illegal wildlife trade in São Paulo city, Brazil. *J. Avian Med. Surg.* [Internet]. 2010; 24(3):199-209. doi: <https://doi.org/czxx2z>
- [18] Janda JM, Abbott SL, Kroske-Bystrom S, Cheung WK, Powers C, Kokka RP, Tamura K. Pathogenic properties of *Edwardsiella* species. *J. Clin. Microbiol.* [Internet]. 1991; 29(9):1997-2001. doi: <https://doi.org/g8w2s2>
- [19] Strauss EJ, Ghori N, Falkow S. An *Edwardsiella tarda* strain containing a mutation in a gene with homology to *shlB* and *hpmB* is defective for entry into epithelial cells in culture. *Infect. Immun.* [Internet]. 1997; 65(9):3924-3932. doi: <https://doi.org/g8w2s3>
- [20] Ling SHM, Wang XH, Xie L, Lim TM, Leung KY. Use of green fluorescent protein (GFP) to track the invasive pathways of *Edwardsiella tarda* in the *in vivo* and *in vitro* fish models. *Microbiology* [Internet]. 2000; 146(1):7-19. doi: <https://doi.org/nx2v>
- [21] Marques LRM, Toledo MRF, Neusa PS, Magalhães M, Trabulsi LR. Invasion of HeLa cells by *Edwardsiella tarda*. *Curr. Microbiol.* [Internet]. 1984; 10:129-133. doi: <https://doi.org/c4gj3g>
- [22] Kokubo T, Iida T, Wakabayashi H. Production of siderophore by *Edwardsiella tarda*. *Fish Pathol.* [Internet]. 1990; 25(4):237-241. doi: <https://doi.org/cg7znn>
- [23] Dhaenens L, Szczebara F, Van Nieuwenhuysse SV, Husson MO. Comparison of iron uptake in different *Helicobacter* species. *Res. Microbiol.* [Internet]. 1999; 150(7):475-481. doi: <https://doi.org/df6s43>
- [24] Inglis V, Roberts R, Bromage N. Bacterial diseases of fish. Oxford (RU): Blackwell Publishing; 1993. Part 2, Enterobacteriaceae; p. 212-336.
- [25] Rondón-Barragán IS, Ramírez-Duarte WF, Gutiérrez G, Eslava-Mocha PR. Edwardsiellosis en tilapia. En: Memorias XIII Jornada de Acuicultura, Instituto de Acuicultura de Los Llanos, Universidad de Los Llanos; 2007. p. 84-88.
- [26] Muroga K. Recent advances in infection disease of marine fish with particular reference to the case in Japan. En: Disease in Asian aquaculture III. Proceedings of the 3<sup>rd</sup> Symposium on disease in Asian aquaculture. Thailand; 1997. p. 21-31.