



Facultad de Veterinaria

Trabajo de
Fin de Grado

Impacto de *Aeromonas salmonicida* subsp *salmonicida* en la salud del rodaballo: Un estudio morfológico e inmunohistoquímico.

Pedro Caicoya Fernández

Grado en Veterinaria

Año 2024

Modalidad del Trabajo: Experimental

Licencia

Excepto donde se haga constar explícitamente, esta obra pertenece a Pedro Caicoya Fernández y está bajo una licencia de “Creative Commons Reconocimiento 4.0 Internacional”.



Resumen

En el presente trabajo se investiga el impacto de *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* en la salud del rodaballo (*Scophthalmus maximus*), un pez crucial para la acuicultura gallega. La forunculosis, enfermedad causada por esta bacteria, se caracteriza por provocar lesiones cutáneas y alteraciones en el comportamiento, particularmente bajo condiciones de estrés como altas temperaturas y mala calidad del agua.

Los objetivos del estudio fueron evaluar el impacto de *A. salmonicida* en el rodaballo mediante análisis morfológico e inmunohistoquímico, identificar las lesiones causadas por la infección y analizar la distribución de los antígenos bacterianos en diferentes órganos del rodaballo.

La metodología incluyó la recolección de rodaballos infectados y el procesamiento de muestras para estudios histológicos. Observación al microscopio de muestras y técnicas inmunohistoquímicas para detectar los antígenos bacterianos.

Los hallazgos macroscópicos revelaron lesiones visibles como exoftalmia, nódulos cutáneos y nódulos en el bazo. Los análisis microscópicos mostraron daño tisular significativo en órganos como el corazón, branquias, piel y sistema digestivo. Además, los antígenos de *A. salmonicida* se localizaron principalmente en las áreas afectadas por lesiones cutáneas y órganos internos.

En conclusión, la infección por *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* tiene un impacto severo en la salud del rodaballo, causando lesiones significativas que pueden identificarse tanto a nivel macroscópico como microscópico. La inmunohistoquímica se demostró como una herramienta útil para detectar la presencia y distribución de la bacteria en los tejidos infectados.

PALABRAS CLAVE: *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* / Rodaballo / Forunculosis / Histopatología / Inmunohistoquímica.

Abstract

The present study investigates the impact of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* on the health of turbot (*Scophthalmus maximus*), a fish of great importance in Galician aquaculture. Furunculosis, a disease caused by this bacterium, is characterized by causing skin lesions and behavioral changes, particularly under stressful conditions such as high temperatures and poor water quality.

The objectives of the study were to evaluate the impact of *A. salmonicida* on turbot through morphopathological and immunohistochemical analysis, to identify the lesions caused by the infection, and to analyze the distribution of bacterial antigens in different organs of the turbot.

The methodology included the collection of infected turbot and the processing of samples for histological studies. Microscope observation of samples and immunohistochemical techniques to detect bacterial antigens.

Macroscopic findings revealed visible lesions such as exophthalmos, skin nodules, and nodules in the spleen. Microscopic analyses showed significant tissue damage in organs such as the heart, gills, skin, and digestive system. Additionally, *A. salmonicida* antigens were mainly located in areas affected by skin lesions and internal organs.

In conclusion, infection by *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* has a severe impact on the health of turbot, causing significant lesions that can be identified both macroscopically and microscopically. Immunohistochemistry proved to be a useful tool for detecting the presence and distribution of the bacterium in infected tissues.

KEYWORDS: *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* / Turbot / Furunculosis / Histopathology / Immunohistochemistry.

Resumo

O presente estudo investiga o impacto de *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* na saúde do rodaballo (*Scophthalmus maximus*), un peixe de grande relevancia na acuicultura galega. A forunculose, enfermidade causada por esta bacteria, caracterízase por provocar lesións cutáneas e alteracións no comportamento, particularmente baixo condicións de estrés como altas temperaturas e mala calidade da auga.

Os obxectivos do estudo foron avaliar o impacto de *A. salmonicida* no rodaballo mediante análises morfolóxicas e inmunohistoquímicas, identificar as lesións causadas pola infección e analizar a distribución dos antíxenos bacterianos en diferentes órganos do rodaballo.

A metodoloxía incluíu a recollida de rodaballos infectados e o procesamento de mostras para estudos histolóxicos. Observación ao microscopio de mostras e técnicas inmunohistoquímicas para detectar os antíxenos bacterianos.

Os achados macroscópicos revelaron lesións visibles como exoftalmia, nódulos cutáneos e nódulos no bazo. As análises microscópicas mostraron danos tisulares significativos en órganos como o corazón, as branquias, a pel e o sistema dixestivo. Ademais, os antíxenos de *A.*

salmonicida localizáronse principalmente nas áreas afectadas por lesións cutáneas e órganos internos.

En conclusión, a infección por *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ten un impacto severo na saúde do rodaballo, causando lesións significativas que poden identificarse tanto a nivel macroscópico como microscópico. A inmunohistoquímica demostrou ser unha ferramenta útil para detectar a presenza e distribución da bacteria nos tecidos infectados.

PALABRAS CLAVE: *Aeromonas salmonicida* subsp *salmonicida* / Rodaballo / Forunculose / Histopatoloxía / Inmunohistoquímica.

Índice

Resumen	2
Abstract	2
Resumo	3
Introducción	6
Acuicultura y producción.....	6
Descripción del rodaballo	7
Crianza	8
Enfermedades frecuentes en la producción del rodaballo.....	9
Forunculosis.....	10
Diagnóstico.....	13
Trasmisión	14
Prevención	15
Tratamiento.....	16
Material y métodos.....	18
Toma de muestras e inspección.....	18
Procesado de las muestras para su estudio histológico	20
Tinción	20
Inmunohistoquímica	21
Resultados	22
Hallazgos macroscópicos.....	22
Hallazgos microscópicos	24
Distribución de los antígenos de Ass	29
Discusión.....	32
Conclusiones	34
Bibliografía	35

Introducción

Acuicultura y producción

En el siglo XXI, ha habido un creciente reconocimiento de la importancia de los sectores pesquero y acuícola en la garantía de la seguridad alimentaria y la nutrición a nivel mundial. Para continuar ampliando esta contribución, se requiere acelerar cambios transformadores en políticas de gestión, innovación e inversión, con el objetivo de alcanzar una pesca y acuicultura globales sostenibles y justas. En 2022, la producción mundial de pesca y acuicultura alcanzó un récord de 223,2 millones de toneladas. La producción de animales de acuicultura superó por primera vez la de la pesca de captura (51 %) (FAO, 2024).

La acuicultura de peces marinos está dominada por el salmón del Atlántico (*Salmo salar*), Noruega encabeza su producción, seguido de Chile, Reino Unido, Canadá e Irlanda. Otros peces marinos económicamente importantes son: la dorada (*Sparus aurata*), la lubina (*Dicentrarchus labrax*) y el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) en países como Grecia, Italia, Francia, España y Portugal. En Japón, los peces más producidos son: el hamachi (*Seriola quinqueradiata*), el ayu (*Plecoglossus altivelis*), la platija de oliva (*Paralichthys olivaceus*) y la dorada de Japón (*Pagrus major*) y en el continente africano se cultiva la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Toranzo et al., 2005; APROMAR, 2023).

En cuanto al rodaballo, España, es el principal país productor de Europa, cosechó 8.766 toneladas, lo que representa el 11,2% del total, un 1,5% más que en 2021. El tercer productor es Portugal con 3.600 t, lo que representa el 4,6% del total, seguido por Países Bajos y Francia con 100 t, lo que representa el 0,1% del total. Para 2023, se espera que se mantenga una cifra similar de aproximadamente 79.000 t. Aunque tanto las cifras como la especie exacta son imprecisas, China destaca con una producción significativa de alrededor de 66.000 toneladas en 2022 fuera de la Unión Europea (APROMAR, 2023).

En los últimos 35 años producción acuícola de rodaballo en Galicia ha experimentado un crecimiento importante que ha situado a la región a la cabeza de las áreas productivas de esta especie en Europa. El entorno físico de la costa gallega presenta buenas condiciones para este tipo de cultivo, sin las cuales su rápida expansión no habría sido posible. La riqueza del agua, su temperatura y su bajo nivel de contaminación son características clave para obtener una producción abundante, de rápido crecimiento y en buenas condiciones higiénico-sanitarias (Fernández-González et al., 2021).

Según APROMAR (2023), la comunidad autónoma de Galicia produjo la mayor parte de la cría de rodaballos de España en 2022. El valor medio en primera venta, se estimó un precio de 11,6 € por kilogramo en 2022, generando un total de 101,8 millones de euros. Al igual que con la dorada y la lubina, la cantidad de rodaballo silvestre capturado por la flota española es cada vez más escasa y testimonial para los mercados. En el caso del rodaballo, si comparamos las capturas pesqueras con la producción acuícola, APROMAR (2023) indica que el 91,7% proviene de la acuicultura.

Descripción del rodaballo

El rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.) es un pez teleósteo que pertenece al Orden Pleuronectiformes y a la Familia Scophthalmidae. Este pez bentónico vive en fondos marinos de arena y piedras a profundidades de 20 a 75 metros en su hábitat natural. Es un pez plano sin simetría con una forma romboidal prácticamente redondeada con ojos en el lado izquierdo (figura 1). Aunque no tiene escamas en su piel, sí tiene protuberancias óseas que se encuentran de manera irregular en su cuerpo. La mayoría de las veces, el flanco inferior carece de pigmentación, pero la parte superior del cuerpo tiene una tonalidad marrón parduzca que puede variar en intensidad dependiendo del entorno en el que vive (Faílde et al., 2014; FAO, s.f). No muestran diferencias entre sexos visibles, sin embargo, los machos tienden a ser más pequeños y a crecer más lentamente. Su madurez sexual se alcanza entre el tercer y quinto año de vida, dependiendo de la temperatura del agua. En la edad adulta, ciertos individuos pueden llegar a pesar hasta 25 kg y medir hasta 1 metro de longitud (APROMAR, 2023).

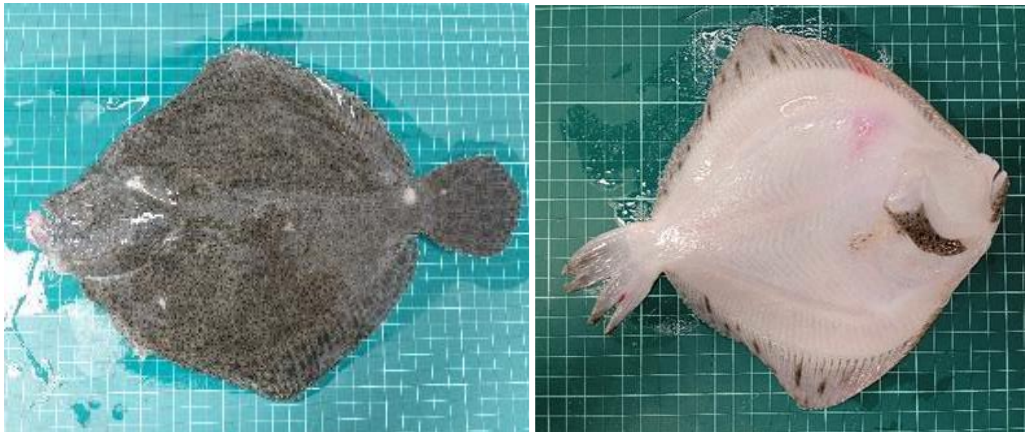


Figura 1: Rodaballo macho de 554g

La reproducción ocurre en la región mediterránea entre febrero y abril, mientras que en el Atlántico ocurre entre mayo y agosto. En Galicia, la freza ocurre en los meses de mayo, junio y julio debido a un aumento gradual del fotoperíodo y la temperatura del agua. Se encuentra a lo largo de las costas del Atlántico Nororiental, desde Marruecos hasta las costas de Gran Bretaña e Islandia, el Mediterráneo y el Mar Negro (figura 2) (FAO, s.f).



Figura 2: distribución costera del rodaballo indicada con una línea naranja (Losada, 2013).

Crianza

La riqueza biológica de la costa gallega se debe al afloramiento costero. El viento del norte, predominante en verano, es fundamental al proporcionar agua fría y rica en nutrientes. Si el viento es fuerte y persistente, las temperaturas de la superficie del mar pueden ser incluso inferiores a 16 °C en pleno verano, estas temperaturas son óptimas para la cría y el cultivo del rodaballo (Fernández-González et al., 2021).

La producción se divide en tres fases, larvaria o hatchery, preengorde y engorde (figura 3):

La cría larvaria ha representado uno de los principales desafíos en la producción comercial del rodaballo. El desarrollo de las larvas se lleva a cabo en sistemas intensivos o extensivos. En el sistema intensivo, se emplean tanques pequeños con un control estricto del entorno, donde se mantienen altas densidades de larvas y presas. Después de la eclosión, las larvas inicialmente se alimentan de las reservas vitelinas que tienen almacenadas. La apertura de la boca se produce alrededor del tercer día y a partir de entonces comienzan a alimentarse de rotíferos y artemia. Las presas utilizadas son cultivadas en laboratorio y tienen un valor nutricional limitado (Cerdà-Cuéllar y Blanch, 2004; Peleteiro, 2001; FAO, s.f).

La segunda fase es el pre-engorde, durante la cual los juveniles se crían hasta que alcanzan pesos que oscilan entre 40-100 gramos y se les va introduciendo alimento inerte a partir de los 30-40 días (Person-Le Ruyet, 2010; Peleteiro, 2001; FAO, s.f).

La tercera y última etapa es el engorde, donde los ejemplares permanecen hasta que alcanzan el tamaño y peso comercial deseado (>400g). Con una temperatura de media de 18°C, los rodaballos alcanzan el kilo en 18 meses (Cal et al., 2006; Peleteiro, 2001; FAO, s.f).

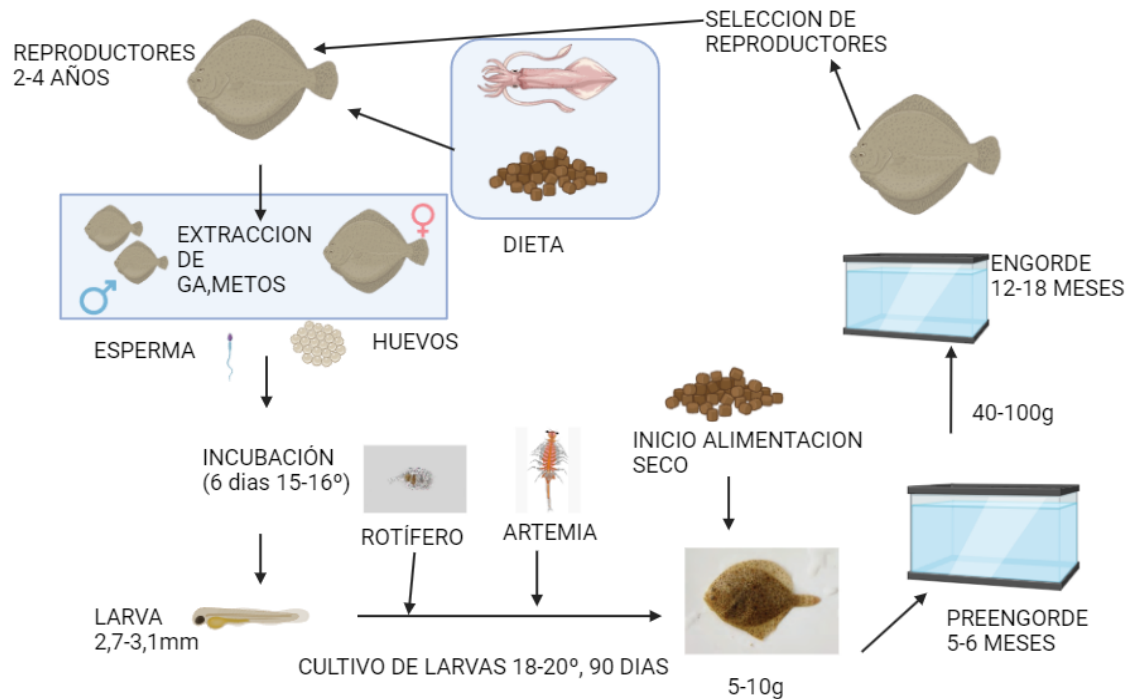


Figura 3: esquema del cultivo del rodaballo. (Modificado de: Rodríguez, J. L., 2011) Creado con: biorender.com

Enfermedades frecuentes en la producción del rodaballo

Como en otras actividades de producción animal intensiva, en la cría del rodaballo las enfermedades son uno de los retos a los que se enfrenta la industria y para las cuales, la investigación es esencial a la hora de comprender tanto la enfermedad como su impacto en los organismos y así desarrollar recursos para afrontarlas. (Aramburu et al., 2023).

Considerando el aumento de rendimiento y la densidad, las enfermedades infecciosas del rodaballo se han convertido en un factor limitante para su cultivo, lo que conlleva grandes pérdidas económicas. En la actualidad, se han identificado varios patógenos que afectan al rodaballo, como *Vibrio anguillarum*, *Tenacibaculum maritimum*, *Edwardsiella piscicida*, *Aeromonas salmonicida*, *Mycobacterium marinum*, *Streptococcus parauberis*, *Enteromyxum scophthalmi* y *Philasterides dicentrarchi*, entre otras. La presencia de esta variedad de agentes aumenta la complejidad del control de enfermedades en la piscicultura de este pez (Gao et al., 2023; Toranzo y col, 2005). Solo un número relativamente pequeño de bacterias son responsables de importantes pérdidas económicas en peces cultivados en todo el mundo (Librán-Pérez et al., 2022). Algunas de las más relevantes serían las aquí descritas:

La vibriosis, causada por *V. anguillarum*, es una enfermedad problemática que provoca septicemia hemorrágica, mejor conocida en granjas de peces marinos, aunque también se ha descrito en moluscos y crustáceos. La bacteria fue aislada por primera vez de anguilas europeas

Anguilla anguilla que sufrían de "peste roja", una condición que se remonta al siglo XVIII. Es reconocida como una enfermedad importante de salmones y otros peces marinos. También se han documentado mortalidades atribuidas a *V. anguillarum* en especies salvajes (Lovy et al., 2024).

E. piscicida, antes conocida como *Edwardsiella tarda*, es una bacteria facultativa intracelular con un amplio rango de hospederos que puede encontrarse tanto en animales como en humanos. Esta bacteria gramnegativa es un patógeno comúnmente hallado en ambientes acuáticos. Su infección produce una enfermedad sistémica que afecta a diversos peces de cultivo y que ha generado considerables pérdidas económicas en la industria acuícola (Ren et al., 2024).

La enteromixosis, causada por *E. scophthalmi*, un parásito mixosporidio, representa una grave amenaza para la piscicultura del rodaballo en Europa, debido a la alta morbilidad y mortalidad observada en los lotes afectados generando importantes pérdidas económicas. Hasta el momento, no se han identificado medidas terapéuticas efectivas para combatirla. Las principales lesiones macroscópicas consisten en la presencia de un derrame serosanguinolento en la cavidad celómica y áreas hiperémicas que afectan las superficies serosas intestinales, así como la acumulación de líquido dentro del tracto digestivo. Ocasionalmente se observó una leve esplenomegalia (Bermúdez et al., 2010; Losada et al., 2012).

La escuticociliatosis, causada principalmente por los ciliados *P. dicentrarchi* y *Miamiensis avidus*, representa una seria enfermedad que provoca altas tasas de mortalidad en las granjas comerciales de peces planos, generando graves pérdidas económicas en este sector de la acuicultura. En Europa, la escuticociliatosis en rodaballo se atribuye específicamente a *P. dicentrarchi*. Actualmente, se usa el formaldehído para controlar la enfermedad, y el uso de autovacunas solo puede prevenir parcialmente los brotes infecciosos (Sueiro et al., 2022; Harikrishnan et al., 2009).

Por último, y siendo el patógeno objetivo de este trabajo, *Aeromonas salmonicida* subsp *salmonicida* (Ass) es el patógeno de peces más antiguo conocido, actualmente es endémico en zonas de agua fría y templada. La enfermedad que produce se le da el nombre de forunculosis. Aunque es más conocido por afectar a salmónidos, otras especies pueden ser infectadas también. Se asocian signos clínicos variados con la infección en diferentes especies, aunque las ulceraciones cutáneas, y las hemorragias son características recurrentes (Menanteau-Ledouble et al., 2016).

Forunculosis

Emmerick y Weibel en 1894 fueron los primeros en registrar la presencia de forunculosis al observar lesiones cutáneas en truchas marrones. Después de aislar la bacteria, indujeron la infección experimentalmente en otros peces y la denominaron *Bacterium salmonicida*. Más

adelante, el nombre fue modificado a *Bacterium truttae*, pero esta discrepancia taxonómica fue posteriormente corregida restaurando el nombre original. Finalmente, con la creación de un nuevo género, su posición taxonómica quedó establecida como *A. salmonicida* (Bruno, 2015).

En España, la primera vez que se documentó *A. salmonicida* fue en 1968 afectando a truchas de los ríos de Asturias y Castilla León. En Galicia, en 1987 se detectó *A. salmonicida* en una granja de trucha arcoíris y en 1989 en una de salmón del Atlántico. En rodaballos no fue detectada hasta 1992 y desde entonces se ha convertido en uno de los patógenos más comunes en las granjas de esta especie en España y Portugal (Cordero del Campillo y col., 1970; Toranzo y col., 2005).

Las especies de *Aeromonas* son bacilos no esporulados, Gramnegativos, generalmente positivos a citocromo oxidasa, anaerobios facultativos y quimioorganotróficos. Se caracterizan por poder crecer en un medio sin cloruro de sodio (NaCl), pero no en un medio con NaCl al 6%, no producen ácido a partir de inositol y la mayoría de ellas son resistentes al agente vibriostático 0/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropiliteridina) (Beaz-Hidalgo & Figueras, 2013).

A. salmonicida afecta principalmente a los salmónidos pero también a otros teleósteos como: el bacalao del Atlántico, *Gadus morhua*; el fletán, *Hippoglossus hippoglossus*; el rodaballo, *Scophthalmus maximus*; la lamprea marina, *Petromyzon marinus*; la carpa, *Cyprinus carpio*; el pez dorado, *Carassius auratus* o la anguila europea, *Anguilla anguilla*, entre otros (Beaz-Hidalgo & Figueras, 2013).

Las cepas de *A. salmonicida* se clasifican como típicas o atípicas según su origen de aislamiento y fenotipo. Se han descrito cinco subespecies, donde *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* es la única subespecie típica, mientras que las demás subespecies *achromogenes*, *masoucida*, *smithia* y *pectinolytica* se consideran atípicas (Vasquez et al., 2022). Si *A. salmonicida* afecta a una especie que no sea el salmón se considera que es una furunculosis atípica (Austin & Austin, 2016).

Se sabe que *Aeromonas spp.* son patógenos oportunistas para los peces, y en condiciones de estrés, como un aumento en la temperatura, la mala calidad del agua, el manejo excesivo, etc., son unas de las principales causas de brotes epidémicos. El desarrollo de una infección depende de la capacidad de una bacteria para adherirse a la piel del hospedador o a sus órganos internos, o para invadir sus células y evadir los mecanismos de defensa del huésped. Las branquias, la piel y el tracto gastrointestinal, así como posibles lesiones o úlceras, se consideran las áreas más vulnerables para la adhesión y colonización bacteriana (Beaz-Hidalgo & Figueras, 2013).

La infección por *A. salmonicida* en salmónidos ha sido tradicionalmente categorizada en tres estadios clínicos basándose en las manifestaciones observadas: hiperaguda, aguda y crónica.

Los signos clínicos de la forunculosis causada por las subespecies típicas y atípicas de *A. salmonicida* en los peces afectados son muy parecidos (Coscelli, Bermúdez, Losada, et al., 2014; Coscelli, Bermúdez, Sancho Silva, et al., 2014).

Las infecciones hiperagudas son más frecuentes en peces de tamaño reducido, los cuales pueden presentar una hiperpigmentación y morir sin manifestar signos clínicos prominentes de la enfermedad. En algunos casos, únicamente puede observarse una ligera exoftalmia (Cipriano & Bullock, 2001).

Las infecciones agudas suelen ocurrir en peces juveniles y adultos, los signos clínicos son: comportamiento de natación errático, ralentización y anorexia. Las lesiones externas se manifiestan como hiperpigmentación y hemorragias en la base de las aletas y la cavidad oral. Internamente el bazo está aumentado de tamaño, y el hígado puede tener hemorragias subcapsulares o necrosis focal del tejido parenquimatoso (Cipriano & Bullock, 2001).

La forma crónica de la forunculosis suele ocurrir en peces adultos refractarios a la enfermedad o entre especies que tienen una mayor resistencia innata a la infección. Puede haber una o más lesiones similares a forúnculos en la dermis y las úlceras pueden extenderse profundamente en la musculatura (Cipriano & Bullock, 2001). El desarrollo de la lesión característica conocida como “forúnculo” no es un hallazgo constante, pero está más a menudo asociado con infecciones crónicas. Cuando estas lesiones están presentes, consisten en exudado de fluido tisular, tejido necrótico con posible contenido de macrófagos. Por lo tanto, la lesión de forunculosis difiere del verdadero forúnculo asociado con vertebrados homeotérmicos. La degeneración de las miofibrillas, la fragmentación de las fibras musculares y la hemorragia de todo el tejido muscular son evidentes dentro de la lesión de hinchazón y conducen a una necrosis colicuativa de la musculatura en las lesiones más graves. *A. salmonicida* se propaga por el sistema (endógena) y se encuentra en la dermis, hipodermis y/o musculatura, lo que provoca la muerte del tejido como resultado de la liberación de enzimas y toxinas bacterianas. (Coscelli, Bermúdez, Sancho Silva, et al., 2014). Pueden desarrollarse émbolos bacterianos en las láminas branquiales, lo que causa una proliferación adicional de células epiteliales branquiales y una fusión subsiguiente de las láminas branquiales que afecta la circulación. (Cipriano & Bullock, 2001).

Además de las lesiones tipo “forúnculo”, en peces no salmónidos como el rodaballo, *A. salmonicida* en su forma crónica produce lesiones cutáneas (nódulos) que consisten en áreas de dermatitis granulomatosa crónica, las cuales a menudo involucran a los tubérculos dérmicos. Los infiltrados inflamatorios ocurren en la dermis, directamente debajo de los tubérculos dérmicos, afectando el estrato compacto e infiltrando el estrato laxo alrededor de los tubérculos (Austin & Austin, 2016; Coscelli, Bermúdez, Sancho Silva, et al., 2014).

Las lesiones ulcerativas en los peces pueden ser una puerta de entrada para bacterias oportunistas. La capacidad de detectar y luego cultivar a partir de las primeras lesiones invisibles mejora definitivamente la capacidad para identificar patógenos importantes y, por lo tanto, ayuda en el diagnóstico de enfermedades bacterianas (Thomas et al., 2013).

Diagnóstico

Para el diagnóstico de la forunculosis en poblaciones animales, es esencial abordar el problema desde una perspectiva poblacional. Como señala Coscelli (2014), la anamnesis, que incluye una historia clínica completa y detallada, así como las características epidemiológicas de la enfermedad y los hallazgos patológicos, es fundamental. El diagnóstico presuntivo de infecciones atípicas por *A. salmonicida* en salmónidos o no salmónidos es más difícil que el diagnóstico de forunculosis típica porque los signos clínicos varían y las lesiones dérmicas a menudo están contaminadas con hongos y bacterias oportunistas (Cipriano & Bullock, 2001).

El aislamiento del patógeno es el diagnóstico definitivo, para ello se recomienda tomar muestras de las lesiones cutáneas y de órganos internos como el hígado, el riñón y el bazo, de animales que son sacrificados por eutanasia o muertos recientemente para evitar la contaminación con otras bacterias. El aislamiento de la bacteria puede realizarse en medios generales suplementados con NaCl, como el Agar de Soja Trypticaseína (TSA), y en medios enriquecidos como el agar sangre. Sin embargo, *A. salmonicida* es un microorganismo difícil de cultivar ya que no existen medios selectivos o enriquecidos que favorezcan su crecimiento cuando no hay microorganismos suficientes para crear colonias (Austin & Austin, 2016; Bruno 2015; Cipriano & Bullock, 2001).

Además de los métodos de cultivo, las pruebas inmunológicas basadas en reacciones antígeno-anticuerpo son ampliamente utilizadas para la detección de antígenos bacterianos en los tejidos. Estas pruebas incluyen ensayos de aglutinación y métodos inmunoenzimáticos como ELISA, DotBlot, Western Blot e inmunohistoquímica (IHQ) (figura 4). Se han desarrollado técnicas moleculares basadas en la hibridación de ácidos nucleicos y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para superar los problemas de sensibilidad y especificidad de estos métodos. Debido a su mayor sensibilidad y especificidad, la PCR convencional y la PCR en tiempo real (qPCR) son las técnicas más utilizadas (Austin & Austin, 2016; Coscelli, Bermúdez, Losada, et al., 2014). Además de la detección del ADN bacteriano, la qPCR nos puede ayudar a determinar la virulencia, el estudio realizado por Rivera et al., (2015) establece una metodología efectiva para la cuantificación de la expresión génica de virulencia en *Ass* utilizando qPCR, desarrollando métodos que contribuirán a una mejor comprensión de los mecanismos de virulencia de *Ass*, ayudando en la prevención de epizootias causadas por este patógeno.

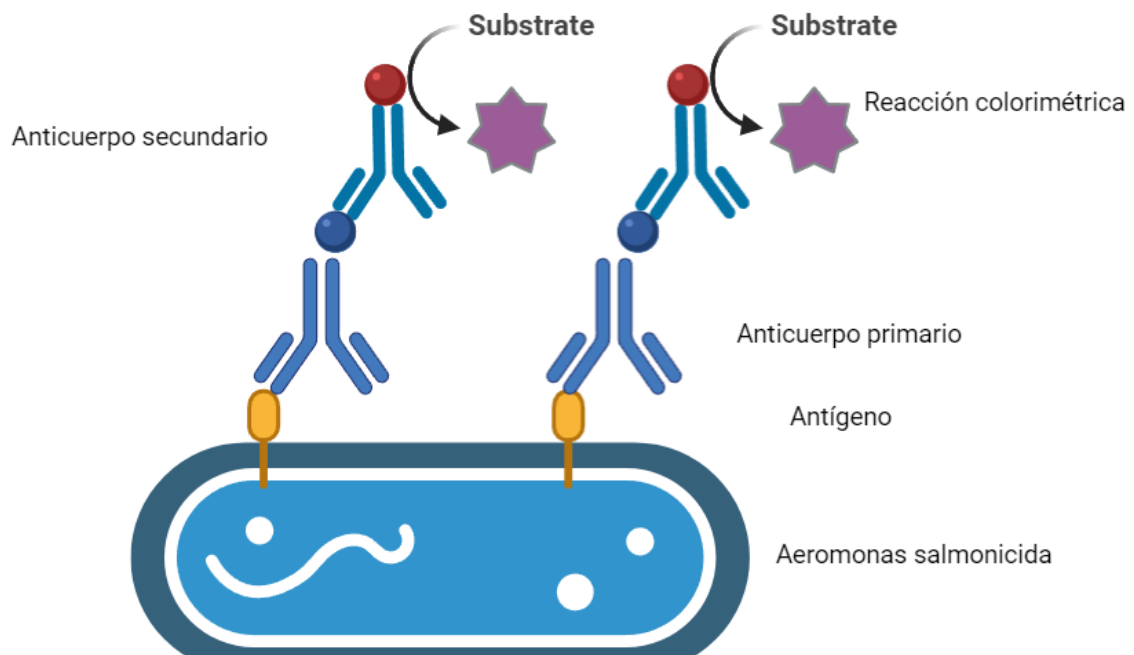


Figura 4: Esquema de la inmunohistoquímica. Creado con: Biorender.com

Trasmisión

Los peces juegan un papel importante en la transmisión de *A. salmonicida* entre ellos, pueden actuar como fuente de infección de dos maneras: aquellos que han muerto o están enfermos altamente contaminados con el patógeno, pueden liberar la bacteria. Se encontró que *A. salmonicida* permanece viable en tejido muscular de peces durante 32 días y durante 40 días en el agua del tanque donde se mantenían los peces muertos, proporcionando una posible fuente de infección para peces saludables. Otro estudio mostró que *A. salmonicida* permanecía viable en tejidos y órganos internos (corazón, hígado, bazo y riñón) 49 días a -10°C (Austin & Austin, 2016; Cipriano & Bullock, 2001).

El segundo mecanismo por el cual los peces pueden ser una fuente de infección es convirtiéndose en portadores de *A. salmonicida*. Debido a la evidente importancia que tienen los peces portadores en el contagio de la forunculosis, siendo un reservorio para ella, es esencial que los métodos utilizados para detectar su presencia sean efectivos. El estrés, altas temperaturas e inyecciones con corticoesteroides reactivan la enfermedad en los peces. Otro aspecto problemático de los portadores es que la terapia con antibióticos para controlar los brotes no necesariamente elimina por completo la bacteria de los tejidos de los peces (Austin & Austin, 2016; Cipriano & Bullock, 2001).

Otro aspecto importante de la transmisión es la diseminación dentro del hospedador. Se cree que *A. salmonicida* entra a través de erosiones en piel, boca, branquias y ano, y se distribuye por el organismo hematógicamente (Austin & Austin, 2016). En el estudio realizados por Coscelli, Bermúdez, Sancho Silva, et al., (2014) se llega a la conclusión de que la falta de nódulos en el lado ciego descartaría la entrada de las bacterias favorecida por el efecto traumático de la superficie del fondo y que la llegada de la bacteria a los nódulos ha de ser vía hematógica.

Prevención

La vacunación es uno de los métodos más efectivos de control de enfermedades, ya que ayuda a reducir significativamente los brotes y el uso de antibióticos en la acuicultura. La vacunación se aplica ampliamente en la industria acuícola debido a su bajo costo (Zhou et al., 2023). La mayoría de las vacunas disponibles comercialmente están específicamente formuladas para salmónidos, sin embargo, el incremento en el número y volumen de producción de especies no-salmónidas en acuicultura, como por ejemplo el rodaballo, plantea la necesidad de avanzar en el desarrollo de nuevas vacunas (Coscelli et al., 2015).

La vacuna autógena de antígenos específicos aislados en rodaballo es importante para la estimulación del sistema inmunológico de esta especie. Los ensayos de vacunación en laboratorio muestran claramente que la administración por inyección es efectiva en la protección del rodaballo contra *Ass* con niveles significativamente altos, y muy bajos o casi ausentes por inmersión. Se sabe que diversos adyuvantes se utilizan frecuentemente en las vacunas para peces para aumentar su efecto protector. Las vacunas con adyuvantes oleosos muestran una mejor eficacia en términos de efectos protectores en comparación con las vacunas acuosas, pero producen celomitis crónica y adherencias fibrosas entre los órganos de la cavidad celómica. En conclusión, las vacunas y los procedimientos de vacunación deben adaptarse a la especie de pez y a las condiciones específicas de cada sistema de producción (Björnsdóttir et al., 2005; Coscelli et al., 2015; Santos et al., 2005; Xiu et al., 2024).

El desarrollo de cepas resilientes a través de la cría selectiva es una medida cada vez más aplicada para controlar las enfermedades en las piscifactorías. La resistencia frente a enfermedades específicas que afectan a las especies acuícolas ha mostrado heredabilidades significativas, lo que sugiere su potencial para la mejora genética. A pesar de la naturaleza compleja de este proceso, los avances en tecnologías genómicas han permitido desentrañar la variación genética subyacente a estos rasgos, y se han identificado loci de rasgos cuantitativos que explican una proporción significativa de la varianza fenotípica para su aplicación en programas de cría. Además, en ocasiones ha sido posible desentrañar los diferentes componentes de la resiliencia evaluando la resistencia a ser infectado y la tolerancia para sobrevivir una vez infectado (Aramburu et al., 2023).

Tratamiento

Actualmente, el tratamiento contra *A. salmonicida* se enfoca en el uso de antibióticos con el objetivo de disminuir la morbilidad y mortalidad en las poblaciones afectadas. Esto ayuda a limitar la liberación del patógeno en el medio ambiente y previene nuevas infecciones dentro de la población. Los antibióticos utilizados en rodaballos incluyen ampicilina, amoxicilina, gentamicina, trimetoprim, ofloxacina, eritromicina, estreptomina, cefalotina, sulfadiazina, oxitetraciclina, ácido nalidíxico y sulfamerazina (Hegde et al., 2023).

El uso indiscriminado de antibióticos provoca la aparición de resistencia en las poblaciones bacterianas que requiere el desarrollo de tratamientos alternativos. La terapia con fagos puede reemplazar o complementar la terapia con antibióticos en la acuicultura. Los estudios publicados sobre el tratamiento con fagos de infecciones por *Aeromonas* en peces se basaron en bacteriófagos que atacan a *A. hydrophila* y *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*. Sin embargo, los patógenos acuáticos son diversos y a menudo incluyen una mezcla de especies de *Aeromonas*. Por lo tanto, es esencial ampliar la búsqueda de nuevos fagos específicos para bacterias del género *Aeromonas* (Morozova et al., 2023).

Entre estos métodos alternativos, se ha demostrado que los probióticos desempeñan un papel importante en la acuicultura y han sido ampliamente utilizados en medicina humana y veterinaria. Principalmente consisten en bacterias lácticas del género *Lactobacillus* spp. El modo de acción general de los probióticos implica que una bacteria benigna coloniza el intestino y evita que las bacterias dañinas hagan lo mismo. Los organismos patógenos son obstaculizados por compuestos inhibidores específicos producidos por los organismos probióticos. Proporcionan beneficios a los huéspedes, como mejorar el crecimiento del huésped, reducir la incidencia de enfermedades, y requerir menos quimioterapia. Además, pueden ser usados en diversos entornos acuáticos: agua dulce, agua salobre y agua de mar. Generalmente, son suplementos alimenticios microbianos vivos y/o muertos o aditivos en agua en forma de cepas únicas, múltiples o en combinación con prebióticos u otros inmunoestimulantes, que se administran para mejorar la calidad del agua de cría, mejorar las respuestas fisiológicas e inmunitarias de los animales acuáticos, y reducir el uso de productos químicos y antibióticos en la acuicultura (Hai, 2015; Hegde et al., 2023).

Objetivos

El objetivo principal de este estudio es contribuir con la caracterización de la enfermedad causada por *Ass* en rodaballo, con el propósito de proporcionar una descripción más exhaustiva del cuadro clínico y morfopatológico en infecciones naturales.

Se exponen a continuación los objetivos específicos en los que se basa este trabajo:

- Caracterización morfopatológica de un brote producido por *Ass* en una granja de rodaballos.
- Descripción detallada de la distribución de los antígenos bacterianos en órganos diana mediante técnicas inmunohistoquímicas.

Material y métodos

Toma de muestras e inspección

Los rodaballos que se emplearon en este estudio procedieron de una piscifactoría marina de instalación fija distribuida en tanques de 81 m² situada en Galicia. La toma de muestras se llevó a cabo entre los meses de febrero y marzo. De los tanques diagnosticado mediante qPCR de aeromoniasis se escogieron los 16 con mayor índice de mortalidad. De cada tanque se seleccionó un pez que presentaba lesiones cutáneas compatibles con forunculosis crónica, y nado errático o exoftalmia que son signos de la forma aguda.

Los peces se eutanasiaron mediante una sobredosis de metanosulfonato de triclaína (MS-222) y posterior sección de la médula espinal. Cada pez se pesó en una báscula de precisión. A la inspección externa de los peces se observó con detenimiento, se fotografiaron cara ocular, visceral y cualquier alteración cutánea.

A continuación, se realizó la necropsia completa (figura 5 y 6) cogiendo muestras de todos los órganos que se fijaron en formol tamponado al 10% durante un mínimo de 48h.

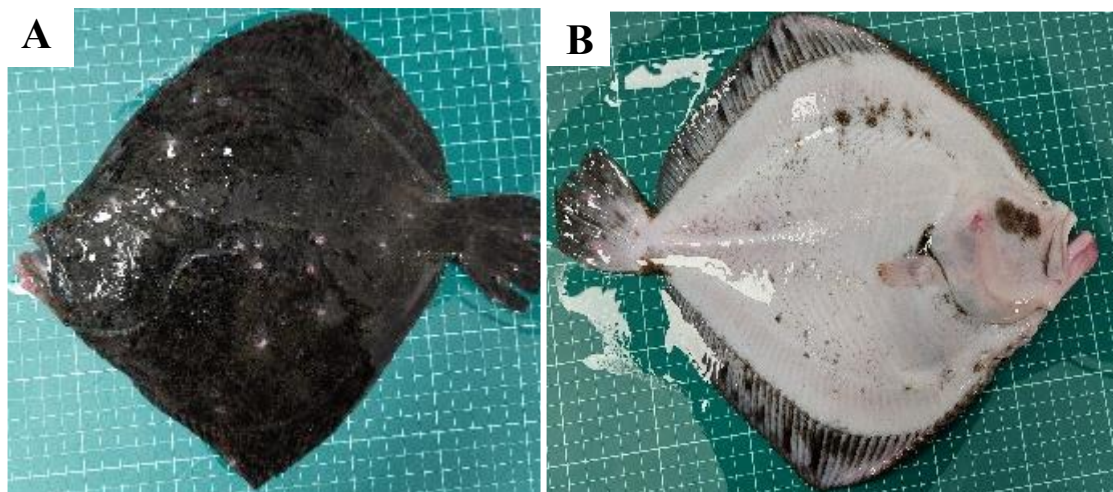


Figura 5: técnica de necropsia empleada: **A**, examen cara ocular. **B**, examen cara ciega.

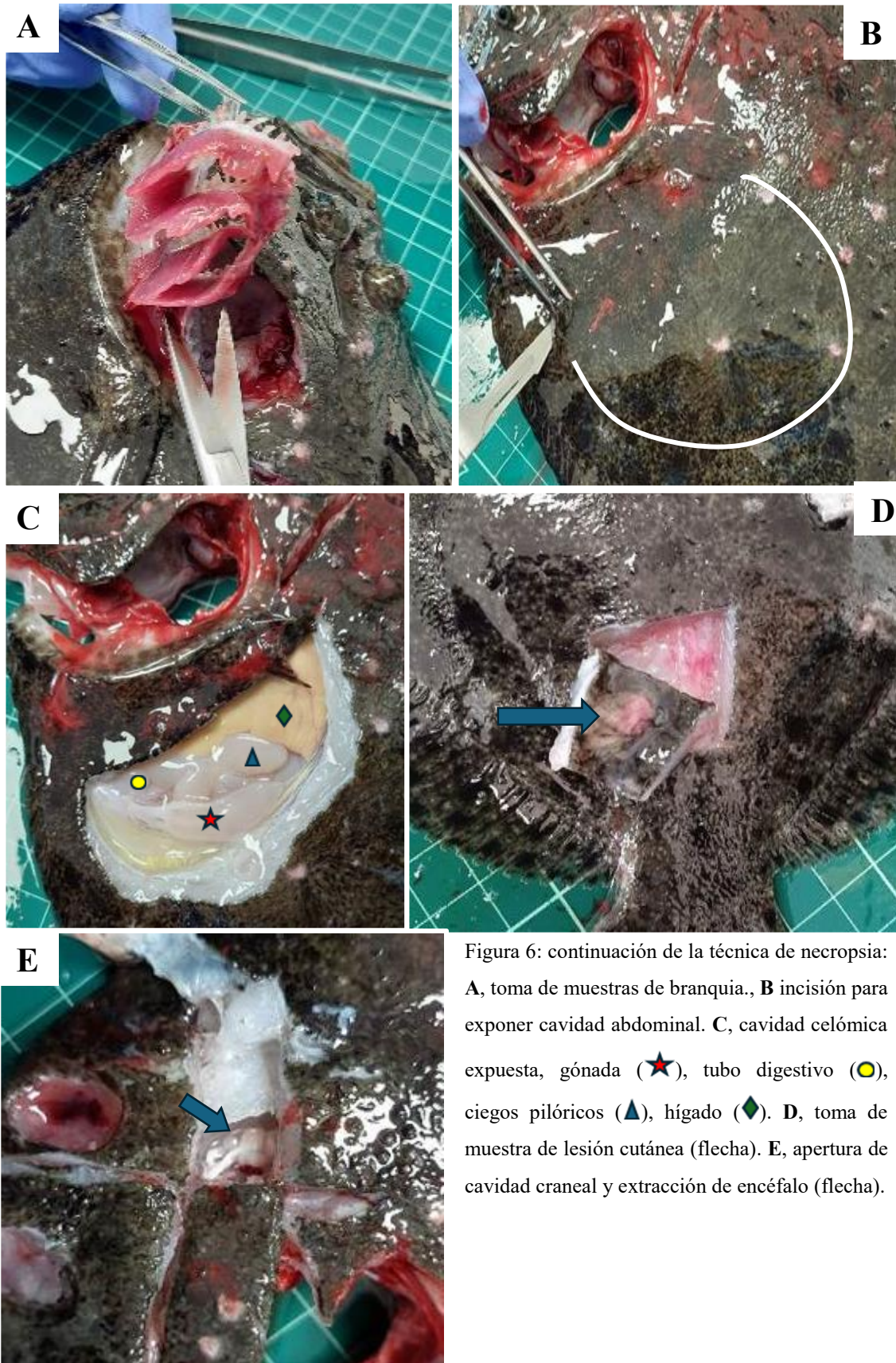


Figura 6: continuación de la técnica de necropsia: **A**, toma de muestras de branquia., **B** incisión para exponer cavidad abdominal. **C**, cavidad celómica expuesta, gónada (★), tubo digestivo (●), ciegos pilóricos (▲), hígado (◆). **D**, toma de muestra de lesión cutánea (flecha). **E**, apertura de cavidad craneal y extracción de encéfalo (flecha).

Procesado de las muestras para su estudio histológico

El procesado de muestras se realizó de manera rutinaria en el laboratorio y consistió en estos pasos:

1. **Tallado:** Las muestras se introdujeron en 6 cassetes de plástico por pez, cortándolas en piezas transversales de 1 cm para conseguir una muestra representativa de cada órgano o conjunto de órganos, con la distribución resumida en la tabla 1:

Distribución de las muestras						
Cassete	1	2	3	4	5	6
Órgano	Branquias	Hígado bazo corazón riñón	Sistema digestivo	Ojos	Piel	Encéfalo

Tabla 1: distribución de las muestras en cassetes para su tallado.

2. **Decalcificación:** Los cassetes con branquias y piel se sometieron a un proceso de decalcificación. Se colocaron en un recipiente con un producto decalcificador comercial durante 24h y luego en etanol al 70% por un mínimo de tres días.
3. **Inclusión en parafina:** Se llevó a cabo un proceso en un inclusor. Las muestras se deshidrataron de forma gradual pasando por varios baños de etanol y xileno acabando en un baño de parafina.
4. **Formación de bloques:** Las muestras fueron orientadas para su posterior corte. El tejido se cubrió con parafina y se dejó enfriar.
5. **Corte:** Los bloques de parafina se cortaron mediante un microtomo de rotación con un grosor de 3 μ m. Los cortes se colocaron sobre portaobjetos silanizados y se secaron durante un día en una estufa a 60°C.

Tinción

Se tiñeron todas las muestras obtenidas siguiendo el protocolo que se resume en la tabla 2

Protocolo de tinción con Hematoxilina-eosina	
1	Desparafinado e hidratado
2	Hematoxilina (2 minutos)
3	Lavados con agua corriente
4	Eosina (1 minuto)
5	Deshidratado
6	Montaje de las muestras con DPX

Tabla 2: proceso de tinción para microscopía óptica.

Inmunohistoquímica

El proceso de IHQ se basó en el descrito por Coscelli, Bermúdez, Losada, et al. (2014), con varias modificaciones en los pasos (tabla 3). El revelado se realizó con VIP Substrate Kit, Peroxidase (HRP) (SK-4600) y el tiempo de bloqueo de peroxidasa se redujo de una hora a treinta minutos.

Protocolo general de tinción inmunohistoquímica	
1	Desparafinar e hidratar
2	Lavar con solución salina tamponada con fosfato (PBS) de 10mM con 0,5% de Tween 20 (pH 7,4) (5 minutos)
3	Bloqueo de la peroxidasa endógena (30 minutos)
4	Lavado en PBS (3 x 5 minutos)
5	Incubación con anticuerpo primario (anti- <i>A. salmonicida</i> T0096.7.1 diluido 1:30000) (2 horas)
6	Lavado en PBS (3 x 5 minutos)
7	Incubación anticuerpo secundario (30 minutos)
8	Lavado en PBS (3 x 5 minutos)
9	Revelado con VIP (1 minuto)
10	Contraste con hematoxilina (3 inmersiones)

Tabla 3: protocolo realizado para la técnica inmunohistoquímica.

Se realizó la técnica IHQ en todos los órganos diana, de acuerdo con lo descrito por Coscelli, Bermúdez, Losada, et al. (2014), incluyendo branquias, hígado, bazo, riñón, corazón y piel. Además, se llevaron a cabo inmunohistoquímicas en todos los órganos en los que se detectaron colonias bacterianas compatibles con *Ass* en la tinción de H-E.

Resultados

Hallazgos macroscópicos

Todos los animales analizados en el presente estudio presentaban en la cara ocular de 1 a 20 lesiones nodulares con un tamaño de 1-10 mm (figura 7 A, B y C), coincidiendo en varias ocasiones con los tubérculos. El área de estas lesiones se encontró elevada y en ocasiones ulcerada, dando lugar a que el centro presentaba un tono de color blanquecino o rojizo. Además, en la capa muscular, también se detectaron lesiones similares a las de tipo “forúnculo” descritas en salmónidos (figura 7 D) que consistían en áreas elevadas y fluctuantes que, al corte, rezumaban contenido amarillento.

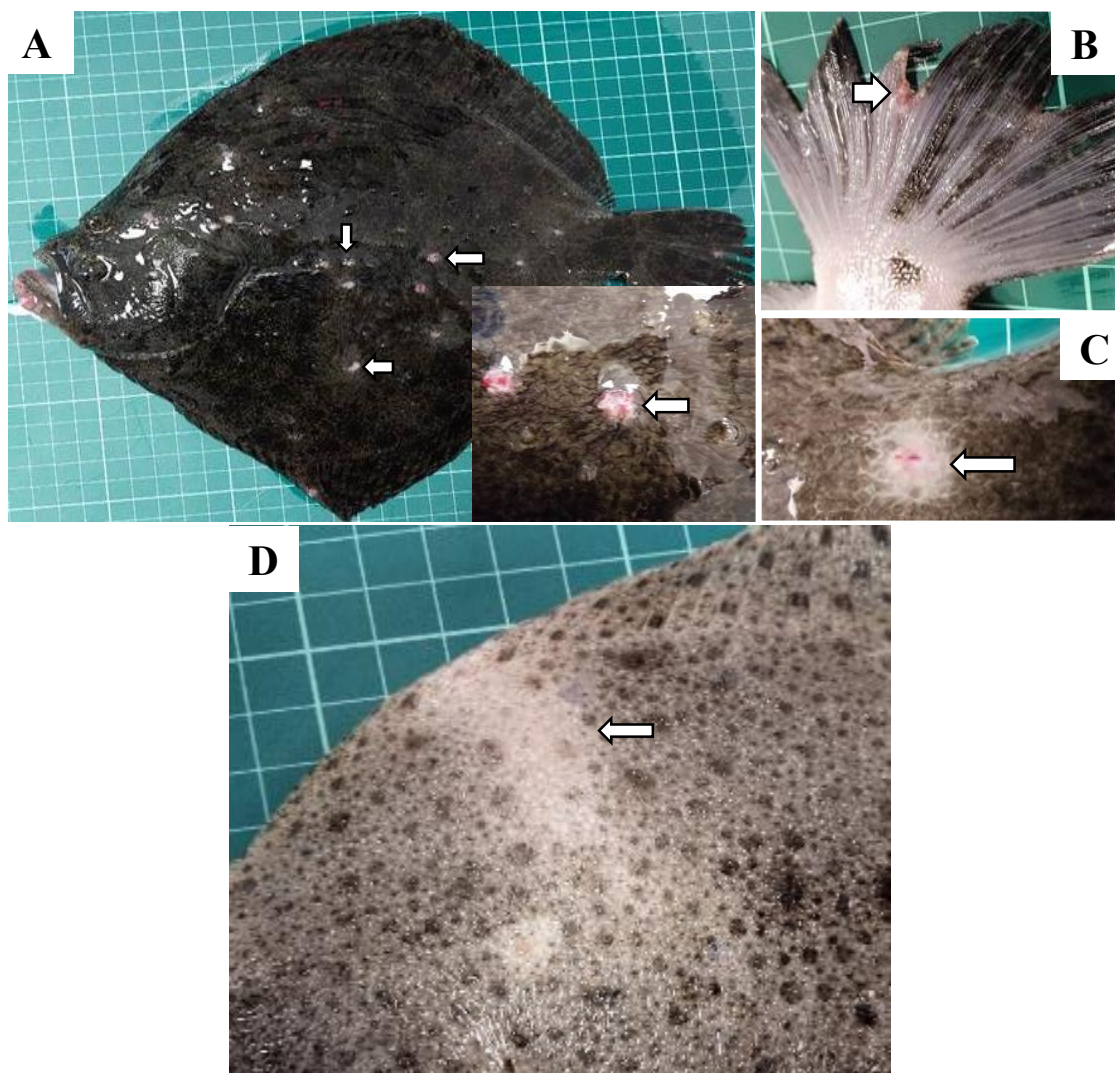


Figura 7: Lesiones macroscópicas: **A**, lesiones nodulares con distribución multifocal y bien delimitadas en el lado ocular (flechas). Recuadro: detalle de una lesión nodular ulcerada con forma crateriforme (flecha). **B**, úlcera en aleta caudal (flecha). **C**, úlcera cutánea rodeada de un halo blanco (flecha). **D**, área hipopigmentada con consistencia fluctuante (flecha).

Se describieron lesiones macroscópicas en diversos órganos. En primer lugar, se observaron ojos protruidos de las cuencas (figura 8 A), branquias blanquecinas y con presencia de depósitos redondeados en los filamentos (figura 8 B). Otro hallazgo significativo fue la presencia en bazo de 1 a 7 nódulos de unos 0,5 mm de diámetro redondos y de color blanco diseminados por la superficie (figura 8 C). Además, también se detectó distensión abdominal que a la apertura contenía un líquido transparente (figura 8 D). Asimismo, se pudo observar el riñón aumentado de tamaño, friable y amarillento (figura 8 E).

En la tabla 3, al final del apartado, se resumen todos os hallazgos macroscópicos clasificándolos por individuos.

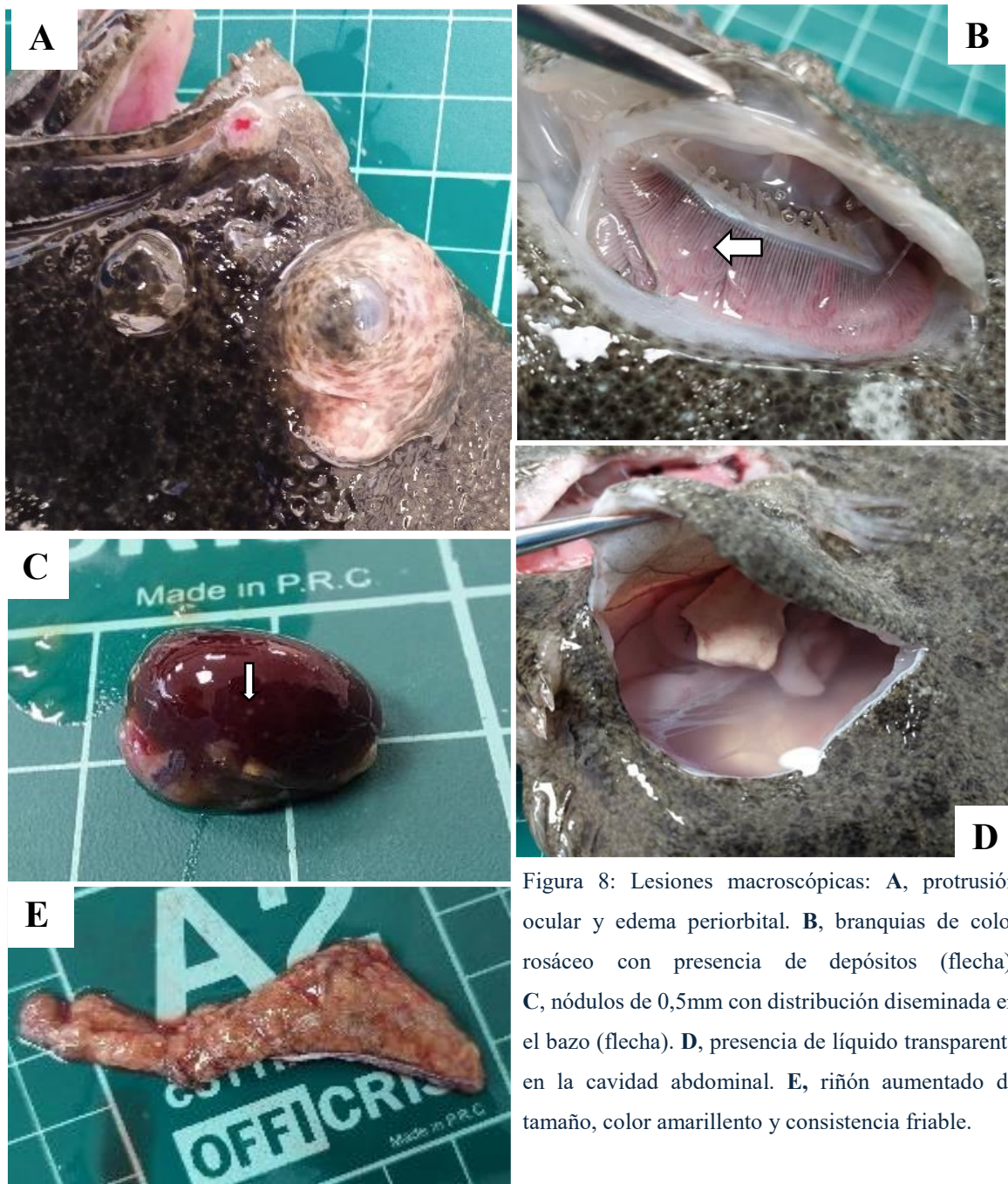


Figura 8: Lesiones macroscópicas: **A**, protrusión ocular y edema periorbital. **B**, branquias de color rosáceo con presencia de depósitos (flecha). **C**, nódulos de 0,5mm con distribución diseminada en el bazo (flecha). **D**, presencia de líquido transparente en la cavidad abdominal. **E**, riñón aumentado de tamaño, color amarillento y consistencia friable.

Hallazgos microscópicos

En la **piel** se observaron dos tipos de lesiones: nódulos y forúnculos. Las características histológicas de los nódulos incluían engrosamiento de la epidermis (figura 9 A) y posterior desprendimiento, condensación de los melanóforos, tubérculos desprendidos (figura 9 B) y con pérdida de su estructura cónica. Los infiltrados inflamatorios se localizaban en la epidermis y dermis, conformados principalmente por macrófagos y células gigantes. Estos hallazgos son característicos de lesiones granulomatosas. Las lesiones macroscópicas tipo “forúnculo” correspondían histológicamente con una miositis con una marcada reacción inflamatoria predominada por células mononucleares, acompañada de necrosis del tejido muscular con presencia de numerosas colonias bacterianas (figura 9 C).

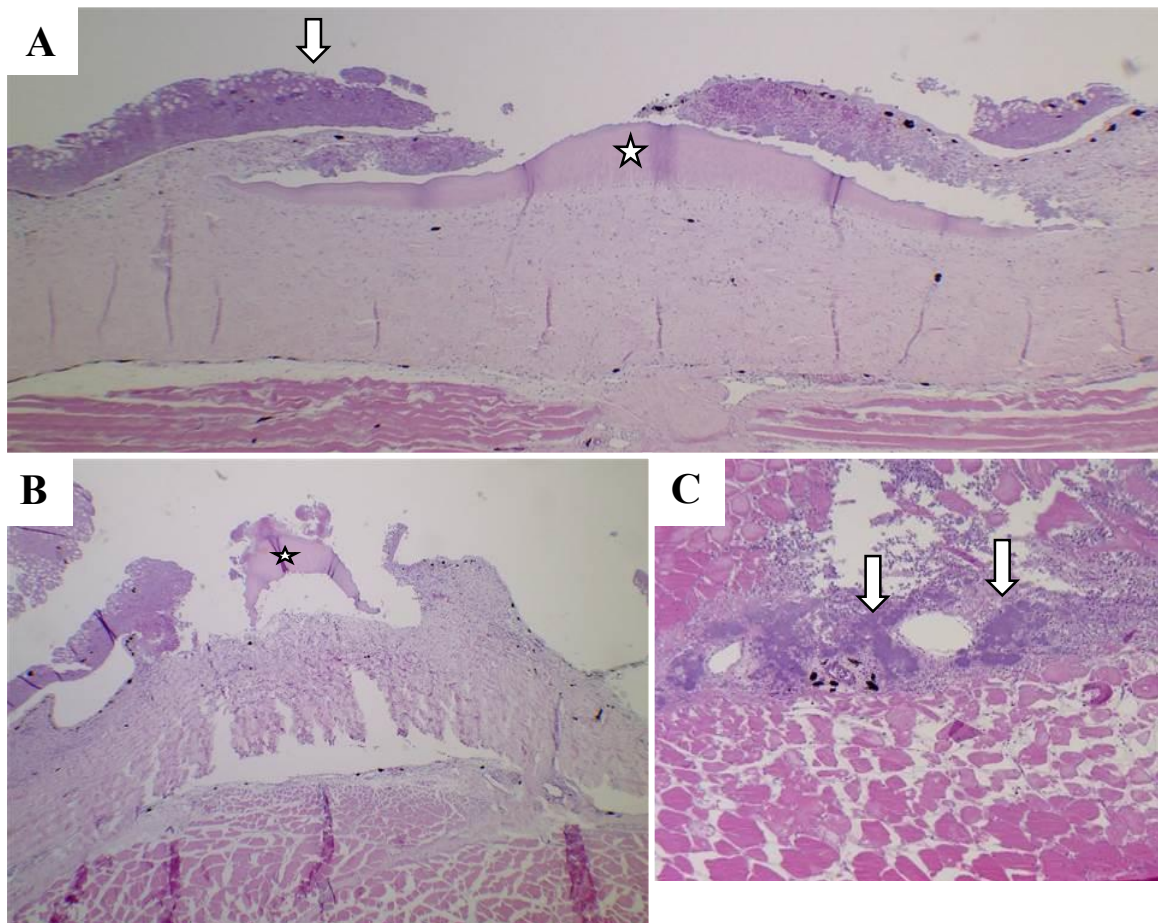


Figura 9: hallazgos microscópicos en piel. **A**, tubérculo expuesto (★), epitelio engrosado, desprendido y colonizado por bacterias (flecha). Recuadro: dermis con colonias bacterianas. **B**, tubérculo totalmente desprendido (★) al igual que en la dermis el extracto compacto del estrato laxo. **C**, bacterias colonizando el músculo provocando necrosis y una marcada inflamación (flechas).

Varios cambios histológicos fueron detectados en las **branquias** asociados a la presencia bacteriana, se pudieron observar colonias bacterianas e inflamación asociada a ellas en el tejido conectivo y epitelial (figura 10 A). Hiperplasia de las laminillas secundarias (figura 10 B), además de fusión de ellas (figura 10 C). Por último, se hallaron colonias en los vasos sanguíneos (figura 10 D)

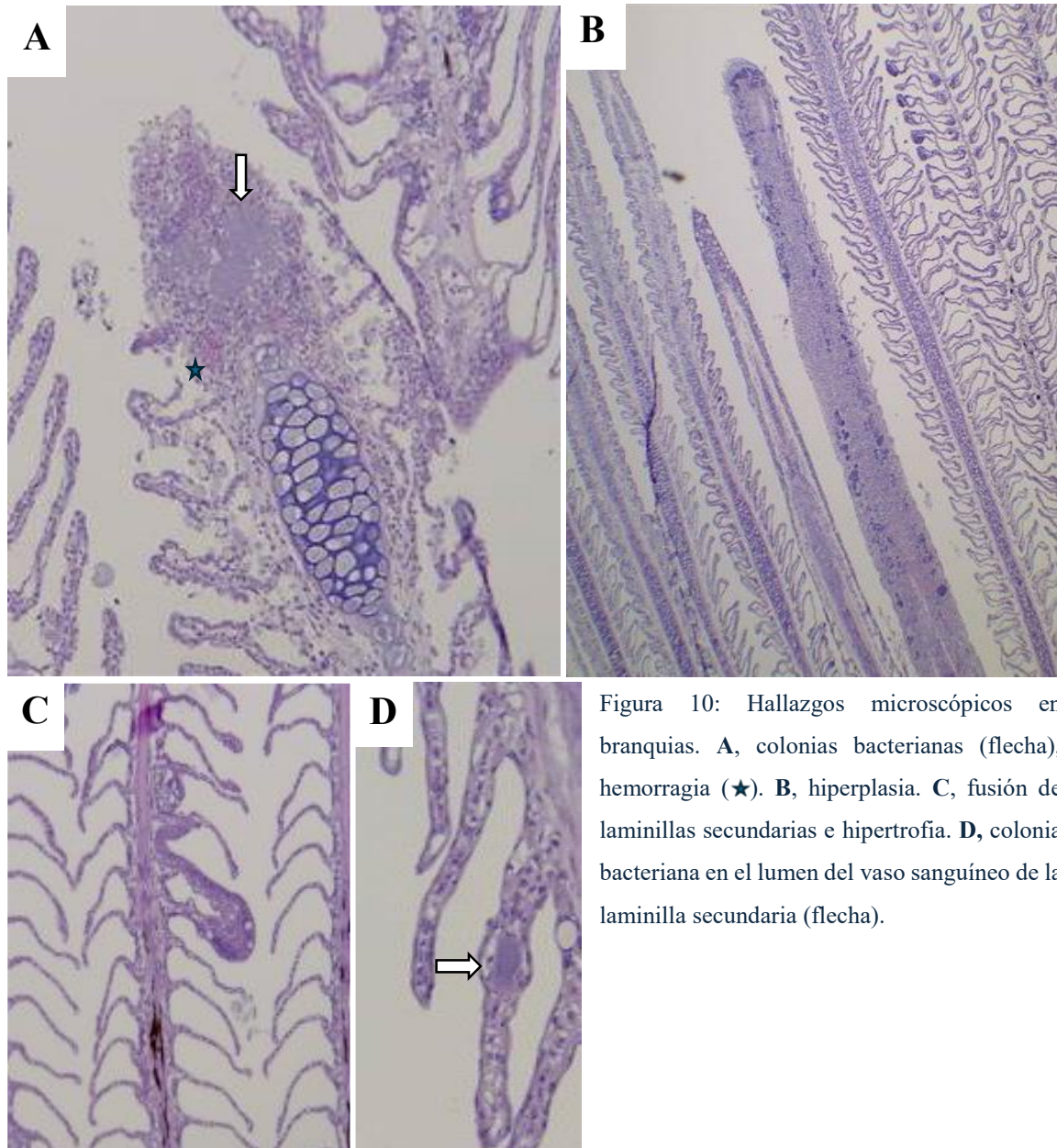


Figura 10: Hallazgos microscópicos en branquias. **A**, colonias bacterianas (flecha), hemorragia (★). **B**, hiperplasia. **C**, fusión de laminillas secundarias e hipertrofia. **D**, colonia bacteriana en el lumen del vaso sanguíneo de la laminilla secundaria (flecha).

El **corazón** es uno de los órganos con un alto porcentaje (64%) de presencia bacteriana. Las bacterias colonizaban el miocardio, induciendo necrosis en los tejidos circundantes (figura 11 A).

En el **riñón**, las bacterias formaban colonias que se distribuían de manera multifocal (figura 11 B) por todo el parénquima, provocando necrosis, edema, hemorragias peritubulares (figura 11 C). En las áreas necróticas, se observaban células mononucleares y cariorrexis.

El **hígado** se encontraba poco afectado por esta patología (2/14), la lesión fue necrosis alrededor de las colonias (figura 12)

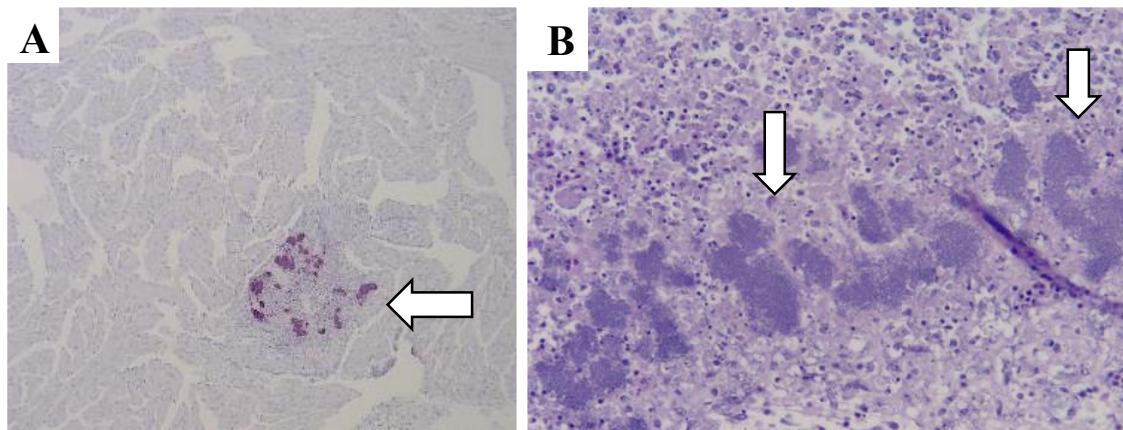


Figura 11: Hallazgos microscópicos en corazón y riñón. **A**, corazón. colonias bacterianas en miocardio (flecha). **B**, riñón, presencia de colonias bacteriana (flechas) y necrosis a su alrededor.

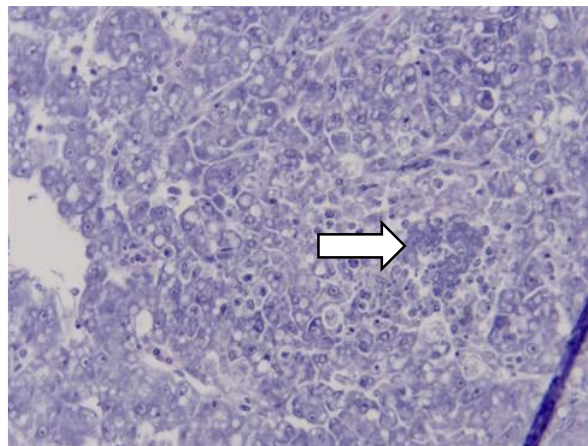


Figura 12: hallazgos microscópicos en hígado: colonias bacterianas en el tejido (flecha) y a su alrededor necrosis y núcleos picnóticos.

En el **bazo**, se observaron colonias bacterianas, acompañada de necrosis e inflamación en la zona afectada (figura 13 A). Además, se identificaron granulomas (figura 13 B), así como depósitos de material compatible con fibrina en el parénquima (figura 13 C)

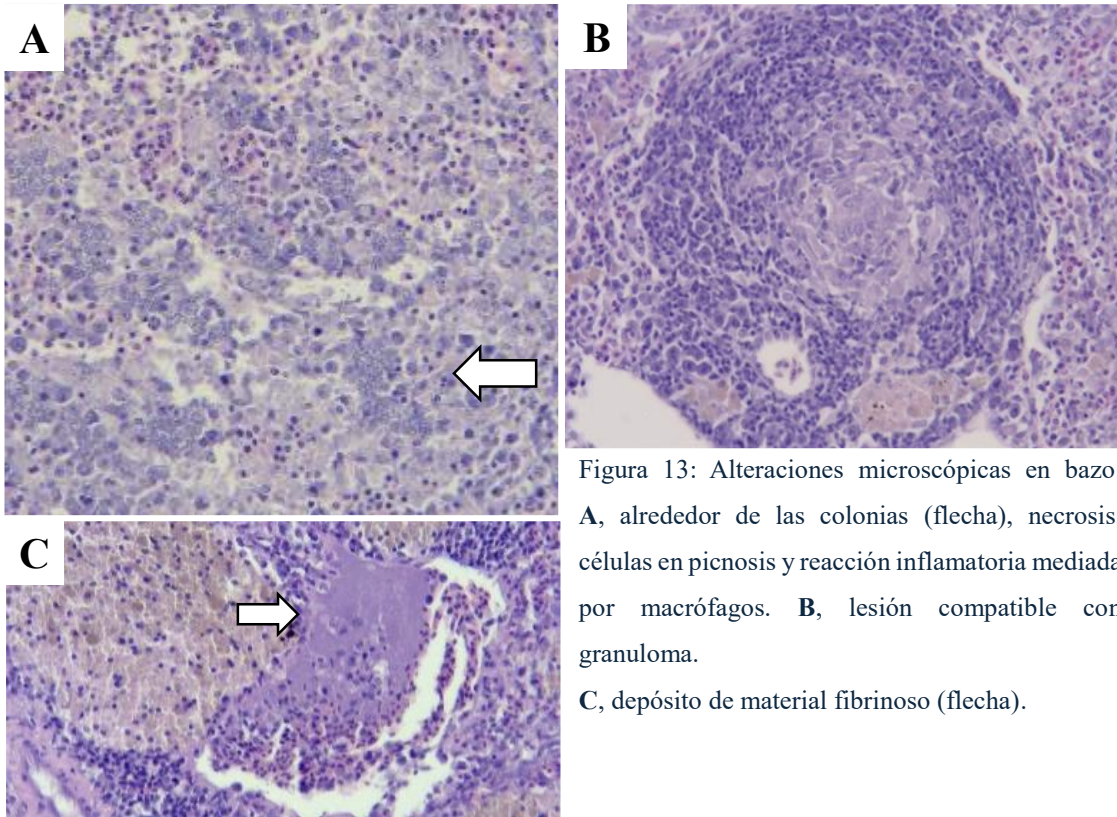


Figura 13: Alteraciones microscópicas en bazo. **A**, alrededor de las colonias (flecha), necrosis, células en picnosis y reacción inflamatoria mediada por macrófagos. **B**, lesión compatible con granuloma. **C**, depósito de material fibrinoso (flecha).

En el **ojo** de un pez con exoftalmia se encontró una colonia bacteriana en la esclerótica (figura 14).

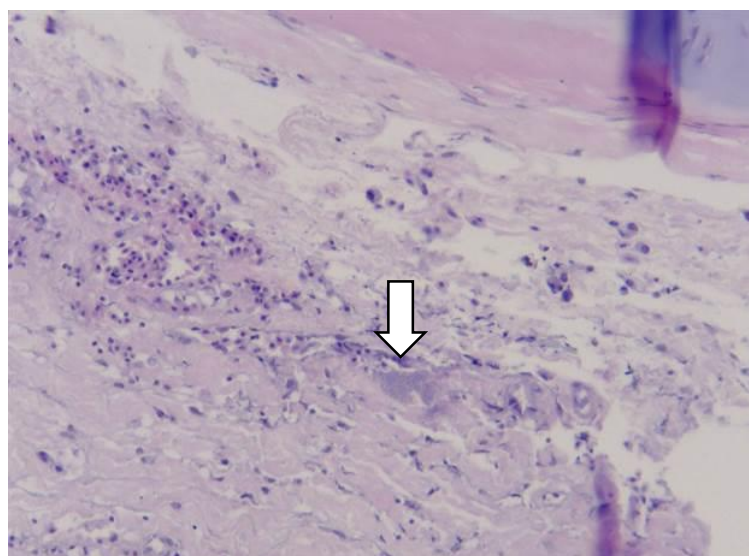


Figura 14: alteraciones microscópicas en ojo: presencia de colonia bacteriana (flecha)

En el **sistema digestivo**, fue poco común encontrar lesiones microscópicas. Solamente en tres casos se observaron colonias bacterianas localizadas en la mucosa digestiva asociadas, en uno de los rodaballos a una marcada reacción inflamatoria y hemorragias (figura 15 A), además en uno de los casos se encontraron colonias en la luz intestinal (figura 15 B).

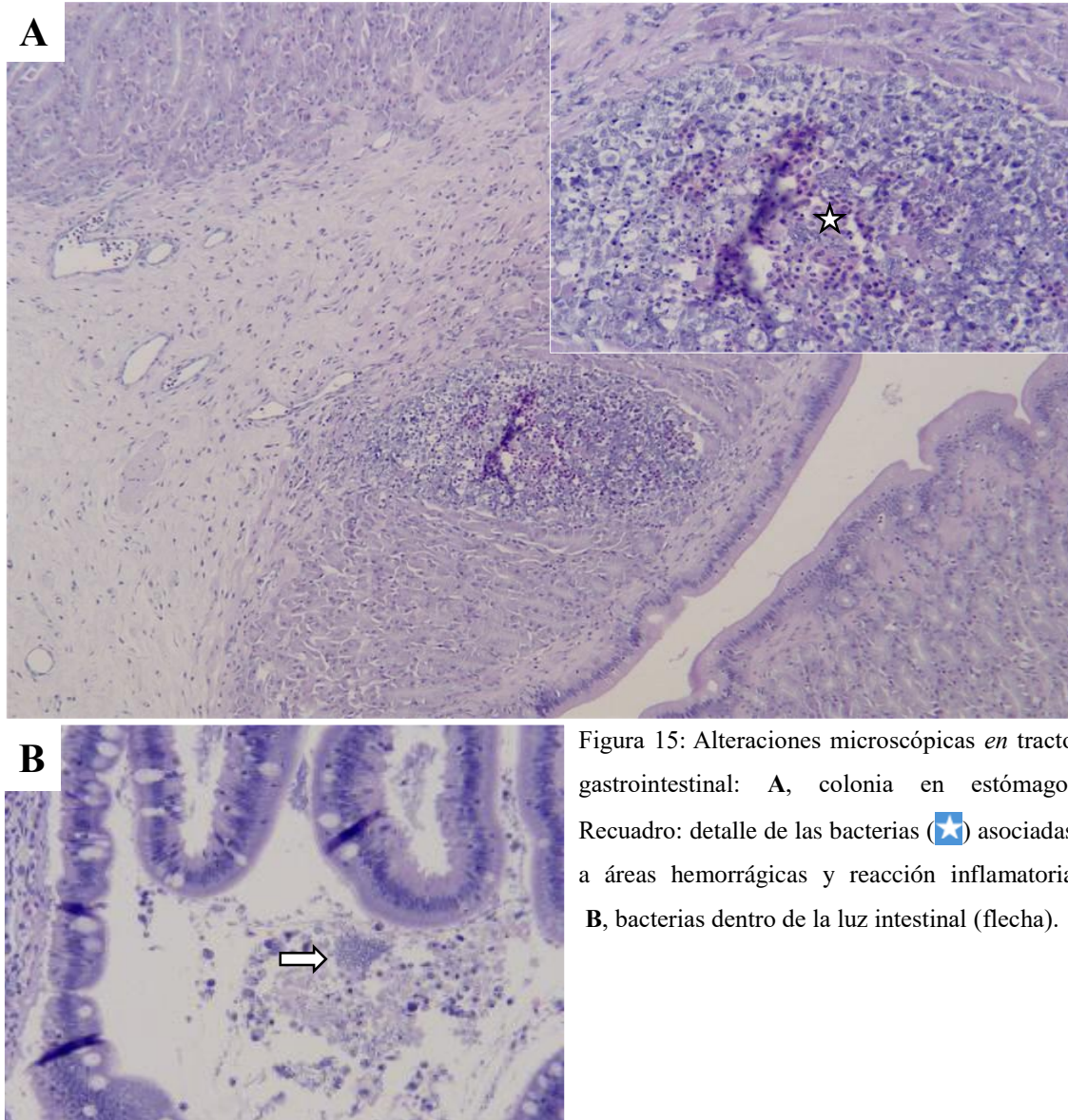


Figura 15: Alteraciones microscópicas *en* tracto gastrointestinal: **A**, colonia en estómago. Recuadro: detalle de las bacterias (★) asociadas a áreas hemorrágicas y reacción inflamatoria **B**, bacterias dentro de la luz intestinal (flecha).

En **encéfalo** no se halló ninguna colonia ni ninguna alteración significativa.

Distribución de los antígenos de *Ass*

Se realizó un estudio de la distribución de los antígenos de *Ass* en branquias, corazón, riñón, bazo, hígado, sistema digestivo, piel y ojos en todos los peces incluidos en este estudio con la técnica IHQ.

En la piel, el antígeno de *Ass* se observó en la dermis (figura 16A) de las lesiones nodulares y en el músculo de las lesiones tipo "forúnculo". En las branquias, el antígeno se encontraba en las laminillas secundarias (figura 16 B). En el hígado, bazo y riñón, los antígenos estaban asociados a los focos de necrosis e inflamación del parénquima (figura 16 D, E y F). En el corazón, se detectó en el miocardio (figura 16 C). En el sistema digestivo, el antígeno se encontró en la luz y en la mucosa (figura 16 G). La colonia bacteriana detectada en el ojo de uno de los individuos también testó positiva para antígenos de *Ass* (figura 16 H).

En dos peces del estudio, a pesar de presentar lesiones compatibles con *Ass*, no se detectaron antígenos ni en las lesiones ni en los órganos comúnmente afectados por esta bacteria.

En la tabla 3 se resumieron todos los resultados de las inmunohistoquímicas.

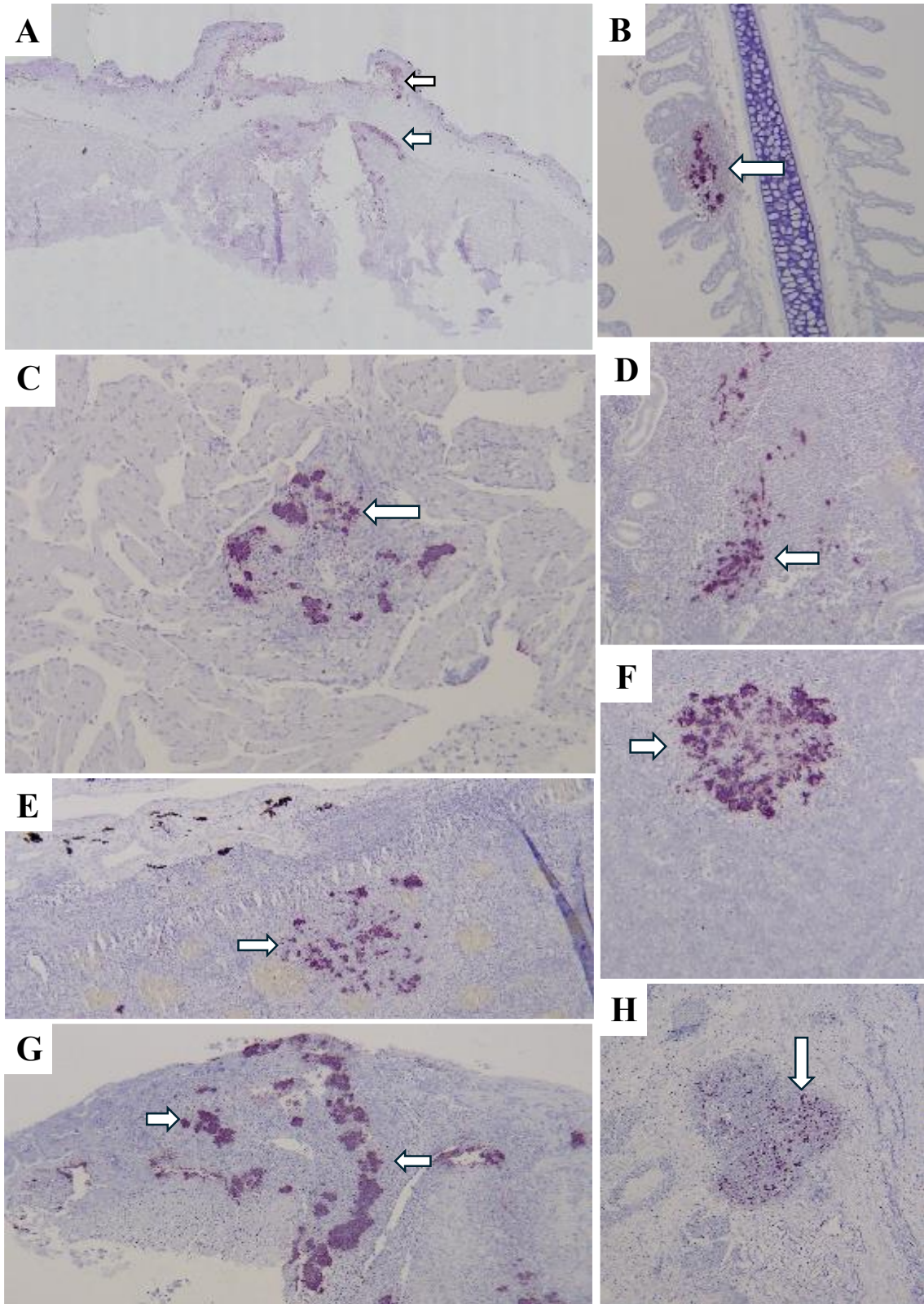


Figura 16: distribución de antígenos de Ass: **A**, piel, inmunopositividad en dermis y epidermis (flechas). **B**, branquia, laminillas secundarias con marcada inmunotinción (flecha). **C**, corazón, antígenos localizados en el miocardio (flecha). **D**, riñón, marcada tinción positiva en el parénquima, asociado a foco necrótico (flecha). **E**, bazo, inmunoreactividad en el parénquima (flecha). **F**, hígado, colonia bacteriana inmunorreactiva rodeada de tejido necrótico (flecha). **G**, digestivo, colonias positivas en la capa muscular (flechas). **H**, ojo, reacción positiva en esclerótica (flecha).

PECES	LESIONES MACROSCOPICAS					RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICA								
	Nódulos piel	Forúnculo	Ascitis	Nódulos en bazo	Exoftalmia	Branquias	Corazón	Bazo	Riñón	Hígado	Piel	Sistema digestivo	Ojo	
1	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	DUDOSO	+	
2	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	NR	NR	
3	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	NR	NR	
4	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	NR	NR	
5	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	NR	
6	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	NR	NR	
7	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	NR	NR	
8	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	DUDOSO	NR	
9	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	NR	NR	
10	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	NR	NR	
11	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	NR	NR	
12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	NR	NR	
13	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NR	NR	
14	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NR	NR	

Tabla 4: Resultados de la inmunohistoquímica y lesiones macroscópicas en cada uno de los individuos recogidos. (+) Positivo. (-) Negativo. (NR) No realizado

Discusión

En la investigación realizada por Coscelli, Bermúdez, Sancho Silva, et al. (2014) se describieron las lesiones en piel de rodaballos infectados naturalmente por *Ass*. Esos peces mostraron nódulos cutáneos ubicados en el lado ocular del cuerpo causando en casos graves ulceración y desprendimiento de los tubérculos dérmicos. Histológicamente estos nódulos correspondían con una dermatitis granulomatosa. Estas fueron las únicas lesiones encontradas en este trabajo, poniendo así en duda el termino forunculosis para referenciar a esta patología. En el presente estudio se ha observado que además de los nódulos también aparecen lesiones que se asemejan a forúnculos en la musculatura como las descritas por Austin & Austin, (2016) típicas de salmones. Las lesiones tipo “forúnculo” y su relación con *Ass* fue corroborada con la técnica de la inmunohistoquímica. Así que si se discute el término de furunculosis que sea porque las lesiones no se parecen a las encontradas en una condición similar en animales homeotérmicos y no por la ausencia de ellas en rodaballos. Sin embargo, como dijeron Austin & Austin (2016) “el nombre se ha establecido en la literatura pesquera, por lo que se ha mantenido por conveniencia y para evitar la confusión que podría resultar de un nuevo nombre”.

Hay una correlación entre las lesiones dérmicas y la infección por *Ass*, 14 de los 16 peces que mostraban nódulos en la piel del estudio fueron positivos a *Ass* en la prueba IHQ. Estos datos resultan útiles en el control de la enfermedad pudiendo así identificar externamente a portadores y eliminadores de la bacteria sin necesidad de pruebas laboratoriales.

El estudio realizado por Coscelli, Bermúdez, Losada, et al. (2014) describió el perfil morfológico de la infección experimental aguda por *Ass* en rodaballo. Este estudio demostró que a las 96 horas post infección, *Ass* se dispersó por la superficie serosa de los órganos celómicos y en el parénquima y vasos sanguíneos de todos los tejidos muestreados (excepto el cerebro y el tracto gastrointestinal). El tejido circundante a las colonias bacterianas mostró cambios necróticos, especialmente evidentes en riñón, hígado, bazo y páncreas, mientras que se detectó necrosis leve en branquias, timo y gónadas. En cambio, en este estudio, lo que se ha demostrado es que además de los cambios estructurales descritos por Coscelli, Bermúdez, Losada, et al. (2014), en una infección natural también se ve afectado el sistema digestivo, encontrando en él colonias bacterianas en las vellosidades y en la luz intestinal, provocando necrosis e inflamación. Otra diferencia con el cuadro agudo descrito por Coscelli, Bermúdez, Losada, et al. (2014) sería la presencia de nódulos de color blanco diseminados por la superficie del bazo que histológicamente coinciden con un granuloma. Estos nódulos no están descritos en rodaballos, pero sí que fueron descritos por Morrison et al., (1984) en bacalao (*Gadus Morhua*) infectados experimentalmente con *A. salmonicida*.

Ringø et al. (2004) y Ringø et al. (2007) describen el daño celular intestinal en el salmón del Atlántico (*Salmo salar* L.) causado por *Ass*, demostrando claramente un destacado desprendimiento de enterocitos en la región anterior del intestino tras la exposición al patógeno. En la parte posterior del intestino, observaron poco desprendimiento, pero detectaron daño celular que involucraba microvellosidades, desmosomas y uniones estrechas. Basándose en estos hallazgos, sugieren que *Ass* puede ingresar al pez al dañar seriamente el revestimiento intestinal. En este estudio, estos hallazgos se ven respaldados ya que, los resultados demostraron que el sistema digestivo se ve alterado cuando este es positivo a *Ass*, se pudo observar enteritis con una reacción inflamatoria predominada por los macrófagos y los enterocitos engrosados y desprendidos de la lámina propia. Dado que ningún trabajo previo ha evaluado los efectos inducidos por *Ass* en la histología del tracto gastrointestinal del rodaballo, los resultados del presente estudio sugieren que puede tener un papel en la patogenia de la enfermedad. Se deben llevar a cabo estudios adicionales para aclarar esta hipótesis.

Entre los aspectos más relevantes nuestro estudio destaca la coexistencia de dos formas de la enfermedad en el mismo animal, peces con signos de forunculosis aguda como nado errático, letargia y exoftalmia que también exhiben signos crónicos como las úlceras en piel. Con la IHQ comprobamos la existencia de antígenos en las lesiones cutáneas y en los órganos diana de la infección aguda (branquia, bazo, corazón bazo e hígado). Estos datos nos permiten hipotetizar sobre la reagudización de la forma crónica. Serían necesarios más estudios sobre vías de entrada, diseminación y transmisión de la enfermedad. No hay ningún precedente bibliográfico sobre la reagudización de *Ass* en peces teleósteos.

En una revisión multiespecie realizada por Lee Herman (1968) se apuntó a que la disminución de las temperaturas podría causar una regresión de la enfermedad de un estado crónico a uno latente, con una curación concurrente de las lesiones en otoño e invierno. Esta afirmación concuerda con los datos obtenidos en este estudio, en el que se observó que 2 peces del estudio que tenían lesiones cutáneas compatibles con forunculosis crónicas y signos clínicos de septicemia resultaron negativos a la detección del antígeno bacteriano en las lesiones cutáneas y en los órganos internos analizados. Las fechas del estudio (febrero y marzo) reafirman la teoría de que la temperatura puede poner en un estado de latencia a la bacteria.

Conclusiones

1. La infección por *Ass* tiene un impacto severo en la salud del rodaballo, causando lesiones significativas que pueden ser identificadas tanto a nivel macroscópico como microscópico. Un brote en una granja se podría identificar por tener animales con exoftalmia, nado errático y lesiones cutáneas.
2. Además de afectar a los órganos descritos en la bibliografía, *Ass* también coloniza el tracto digestivo y el ojo.
3. La inmunohistoquímica es una herramienta útil para detectar la presencia y distribución de la bacteria en los tejidos infectados. Los órganos diana son piel, branquias y corazón, y en menor medida hígado, bazo, riñón, sistema digestivo y ojos.

Bibliografía

- APROMAR. (2023). *La acuicultura en España 2023* [PDF]. Recuperado de https://apromar.es/wp-content/uploads/2023/09/La_acuicultura_Espana_2023_APROMAR.pdf.
- Aramburu, O., Blanco, A., Bouza, C., & Martínez, P. (2023). Integration of host-pathogen functional genomics data into the chromosome-level genome assembly of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, *564*, 739067. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.739067>
- Austin, B., & Austin, D. A. (2016). *Bacterial Fish Pathogens*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-32674-0>
- Beaz-Hidalgo, R., & Figueras, M. J. (2013). *Aeromonas* spp. Whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. *Journal of Fish Diseases*, *36*(4), 371-388. <https://doi.org/10.1111/jfd.12025>
- Beaz-Hidalgo, R., Latif-Eugenín, F., & Figueras, M. J. (2013). The improved PCR of the *fstA* (ferric siderophore receptor) gene differentiates the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* from other *Aeromonas* species. *Veterinary Microbiology*, *166*, 659–663. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.06.020>
- Bermúdez, R., Losada, A., Vázquez, S., Redondo, M., Álvarez-Pellitero, P., & Quiroga, M. (2010). Light and electron microscopic studies on turbot *Psetta maxima* infected with *Enteromyxum scophthalmi*: Histopathology of turbot enteromyxosis. *Diseases of Aquatic Organisms*, *89*, 209-221. <https://doi.org/10.3354/dao02202>
- Björnsdóttir, B., Gudmundsdóttir, S., Bambir, S. H., & Gudmundsdóttir, B. K. (2005). Experimental infection of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), by *Aeromonas salmonicida* subsp. *Achromogenes* and evaluation of cross protection induced by a furunculosis vaccine. *Journal of Fish Diseases*, *28*(3), 181-188. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2005.00617.x>
- Bruno, D. W. 2015. Furunculosis. Revised edition. ICES Identification Leaflets for Diseases and Parasites of Fish and Shellfish. Leaflet No. 37. 5 pp.
- Cal, R. M., Vidal, S., Gómez, C., Álvarez-Blázquez, B., Martínez, P., & Piferrer, F. (2006). Growth and gonadal development in diploid and triploid turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, *251*(1), 99-108. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.05.010>
- Cerdà-Cuéllar, M., & Blanch, A. R. (2004). Determination of *Vibrio scophthalmi* and its phenotypic diversity in turbot larvae. *Environmental Microbiology*, *6*(3), 209–217. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00555.x>

- Cipriano, R. C., & Bullock, G. L. (2001). *Furunculosis And Other Diseases Caused By Aeromonas salmonicida*.
- Cordero del Campillo, M., Aller, B., Martínez, A., Escudero, A., 1970. A propósito de la presencia de forunculosis en la trucha de los ríos de León. Symposium sobre los productos de la pesca y sus industrias, 369-386.
- Coscielli, G. A. (2014). Estudio de la patogenia y de los mecanismos inmunológicos en la infección por *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida* en rodaballos (*Scophthalmus maximus*) [Tesis doctoral, Universidad de Santiago de Compostela]. Santiago de Compostela
- Coscelli, G. A., Bermúdez, R., Losada, A. P., Faílde, L. D., Santos, Y., & Quiroga, M. I. (2014). Acute *Aeromonas salmonicida* infection in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Histopathological and immunohistochemical studies. *Aquaculture*, 430, 79-85. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.002>
- Coscelli, G. A., Bermúdez, R., Sancho Silva, A. R., Ruíz De Ocenda, M. V., & Quiroga, M. I. (2014). Granulomatous dermatitis in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) associated with natural *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida* infection. *Aquaculture*, 428-429, 111-116. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.02.038>
- Coscelli, G. A., Bermúdez, R., Losada, A. P., Santos, Y., & Quiroga, M. I. (2015). Vaccination against *Aeromonas salmonicida* in turbot (*Scophthalmus maximus* L.): Study of the efficacy, morphological changes and antigen distribution. *Aquaculture*, 445, 22-32. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.04.011>
- El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022*. (2022). FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461es>
- El Morabit Laser, A. (2022). Caracterización de *Aeromonas salmonicida* ssp *salmonicida* y estudio de los mecanismos de interacción con el hospedador [Tesis doctoral, Universidad de Santiago de Compostela]. Santiago de Compostela.
- Faílde, L. D., Bermúdez, R., Vigliano, F., Coscelli, G. A., & Quiroga, M. I. (2014). Morphological, immunohistochemical and ultrastructural characterization of the skin of turbot (*Psetta maxima* L.). *Tissue and Cell*, 46(5), 334-342. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2014.06.004>
- FAO. (s. f.). *Psetta maxima* (Linnaeus, 1758). Recuperado de https://www.fao.org/fishery/es/culturedspecies/psetta_maxima_es/es
- FAO. (2024). Versión resumida de El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2024. La transformación azul en acción. Roma.

- Fernández-González, R., Pérez-Pérez, M., & Garza-Gil, M. D. (2021). An analysis of production factors for Galician-farmed turbot: From boom to stagnation. *Aquaculture Economics & Management*, 25(3), 320-338. <https://doi.org/10.1080/13657305.2020.1840659>
- Gao, Y., Wang, Q., Liu, Y., Ma, Y., Jin, H., Liu, J., Wang, H., Yan, Y., & Li, J. (2023). Epidemiology of turbot bacterial diseases in China between October 2016 and December 2019. *Frontiers in Marine Science*, 10, 1145083. <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1145083>
- Hai, N. V. (2015). The use of probiotics in aquaculture. *Journal of Applied Microbiology*, 119(4), 917-935. <https://doi.org/10.1111/jam.12886>
- Harikrishnan, R., Jin, C.-N., Kim, M.-C., Kim, J.-S., Balasundaram, C., & Heo, M.-S. (2009). Effectiveness and immunomodulation of chemotherapeutants against scuticociliate *Philasterides dicentrarchi* in olive flounder. *Experimental Parasitology*, 124(2), 134-140. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.11.005>
- Hegde, A., Kabra, S., Basawa, R. M., Khile, D. A., Abbu, R. U. F., Thomas, N. A., Manickam, N. B., & Raval, R. (2023). Bacterial diseases in marine fish species: Current trends and future prospects in disease management. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(11), 317. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03755-5>
- Lee Herman, R. (1968). Fish Furunculosis 1952–1966. *Transactions of the American Fisheries Society*, 97(3), 221-230. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1968\)97\[221:FF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1968)97[221:FF]2.0.CO;2)
- Librán-Pérez, M., Pereiro, P., Figueras, A., & Novoa, B. (2022). Transcriptome Analysis of Turbot (*Scophthalmus maximus*) Infected With *Aeromonas salmonicida* Reveals a Direct Effect on Leptin Synthesis as a Neuroendocrine Mediator of Inflammation and Metabolism Regulation. *Frontiers in Marine Science*, 9, 888115. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.888115>
- Losada, A. P., Bermúdez, R., Faílde, L. D., & Quiroga, M. I. (2012). Quantitative and qualitative evaluation of iNOS expression in turbot (*Psetta maxima*) infected with *Enteromyxum scophthalmi*. *Fish & Shellfish Immunology*, 32(2), 243-248. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.11.007>
- Losada, A. P. (2013). Enteromixosis del rodaballo: Esclarecimiento de mecanismos y rutas de la respuesta inmunitaria [Tesis doctoral, Universidad de Santiago de Compostela]. Santiago de Compostela.
- Lovy, J., Iwanowicz, L. R., Welch, T. J., Allam, B., Getchell, R. G., Geraci-Yee, S., Good, C., Snyder, J., Raines, C. D., & Das, N. (2024). Seasonal Mortality of Wild Atlantic Menhaden (*Brevoortia tyrannus*) Is Caused by a Virulent Clone of *Vibrio* (*Listonella*) *anguillarum*; Implications for Biosecurity along the Atlantic Coastal United States.

- Transboundary and Emerging Diseases*, 2024, 1-18.
<https://doi.org/10.1155/2024/8816604>
- Menanteau-Ledouble, S., Kumar, G., Saleh, M., & El-Matbouli, M. (2016). *Aeromonas salmonicida*: Updates on an old acquaintance. *Diseases of Aquatic Organisms*, 120(1), 49-68. <https://doi.org/10.3354/dao03006>
- Morozova, V., Babkin, I., Kozlova, Y., Tikunov, A., Ushakova, T., Bardasheva, A., Fedorets, V., Zhirakovskaya, E., & Tikunova, N. (2023). Isolation, Characterization and Genomic Analysis of a Novel Jumbo Phage, AerS_266, That Infects *Aeromonas salmonicida*. *Microorganisms*, 11(11), 2649. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11112649>
- Morrison, C. M., Cornick, J. W., Shum, G., & Zwicker, E. (1984). Histopathology of atypical *Aeromonas salmonicida* infection in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Journal of Fish Diseases*, 7(6), 477-494. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1984.tb01173.x>
- Peleteiro Alonso, J. B. (2004). Control de la reproducción del rodaballo *Scophthalmus maximus* (L., 1758) en cautividad (Tesis doctoral). Instituto Español de Oceanografía, Centro Oceanográfico de Vigo
- Person-Le Ruyet, J., Baudin-Laurencin, F., Devauchelle, N., Métailler, R., Nicolas, J.-L., Robin, J., Guillaume, J., 1991. Culture of turbot (*Scophthalmus maximus*). CRC Handbook of Mariculture. 2, 21-41
- Ren, J., Ma, X., Hu, H., Wang, D., Sun, H., Liu, J., Wang, X., & Zhou, H. (2024). Edwardsiella piscicida causes iron storage disorders by an autophagy pathway in fish monocytes/macrophages. *Fish & Shellfish Immunology*, 146, 109417. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2024.109417>
- Ringø, E., Jutfelt, F., Kanopathipillai, P., Bakken, Y., Sundell, K., Glette, J., Mayhew, T. M., Myklebust, R., & Olsen, R. E. (2004). Damaging effect of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* ssp. *Salmonicida* on intestinal enterocytes of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Cell and Tissue Research*, 318(2), 305-311. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-0934-2>
- Ringø, E., Salinas, I., Olsen, R. E., Nyhaug, A., Myklebust, R., & Mayhew, T. M. (2007). Histological changes in intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following in vitro exposure to pathogenic and probiotic bacterial strains. *Cell and Tissue Research*, 328(1), 109-116. <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0323-0>
- Rivera, L., López-Patiño, M. A., Milton, D. L., Nieto, T. P., & Farto, R. (2015). Effective qPCR methodology to quantify the expression of virulence genes in *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida*. *Journal of Applied Microbiology*, 118(4), 792-802. <https://doi.org/10.1111/jam.12740>

- Santos, Y., García-Marquez, S., Pereira, P. G., Pazos, F., Riaza, A., Silva, R., El Morabit, A., & Ubeira, F. M. (2005). Efficacy of furunculosis vaccines in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.): Evaluation of immersion, oral and injection delivery. *Journal of Fish Diseases*, 28(3), 165-172. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2005.00610.x>
- Sueiro, R. A., Lamas, J., Palenzuela, O., Gulias, P., Diez-Vives, C., García-Ulloa, A., & Leiro, J. M. (2022). A real-time quantitative PCR assay using hydrolysis probes for monitoring scuticociliate parasites in seawater. *Aquaculture*, 557, 738303. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738303>
- Thomas, J., Jerobin, J., Seelan, T. S. J., Thanigaivel, S., Vijayakumar, S., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2013). Studies on pathogenicity of *Aeromonas salmonicida* in catfish *Clarias batrachus* and control measures by neem nanoemulsion. *Aquaculture*, 396-399, 71-75. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.02.024>
- Toranzo, A.E., Magariños, B., Romalde, J.L., 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*. 246, 37-61.
- Vasquez, I., Hossain, A., Gnanagobal, H., Valderrama, K., Campbell, B., Ness, M., Charette, S. J., Gamperl, A. K., Cipriano, R., Segovia, C., & Santander, J. (2022). Comparative Genomics of Typical and Atypical *Aeromonas salmonicida* Complete Genomes Revealed New Insights into Pathogenesis Evolution. *Microorganisms*, 10(1), 189. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010189>
- Xiu, Y., Yi, J., Feng, R., Song, J., Pang, Y., Liu, P., & Zhou, S. (2024). Evaluation of Immune Protection of a Bivalent Inactivated Vaccine against *Aeromonas salmonicida* and *Vibrio vulnificus* in Turbot. *Fishes*, 9(4), 131. <https://doi.org/10.3390/fishes9040131>
- Zhou, S., Zheng, X., Ding, Y., Su, L., Huang, Q., & Xiu, Y. (2023). Immuno-Protective Efficiency of the Bivalent Inactivated Vaccine Against *Vibrio scophthalmi* and *Aeromonas salmonicida* Infections in Turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Journal of Ocean University of China*, 22(4), 1079-1086. <https://doi.org/10.1007/s11802-023-5455-2>