



Tenacibaculosis en lenguado y  
rodaballo: caracterización morfológica  
y de la respuesta inmunitaria.

Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias

Memoria que presenta

**LUIS DANIEL FAÍLDE GARCÍA**

Para optar al Grado de Doctor por la  
Universidad de Santiago de Compostela

Fdo. **Luis Daniel Faílde García**

Lugo, Junio de 2012



**M<sup>a</sup> Isabel Quiroga Berdeal**, profesora del Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias e **Ysabel Santos Rodríguez**, profesora del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela.

INFORMAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada: “Tenacibaculosis en lenguado y rodaballo: caracterización morfológica y de la respuesta inmunitaria” que presenta Luis Daniel Faílde García para optar al Grado de Doctor en Veterinaria, ha sido realizada bajo su dirección y, considerando que se encuentra finalizada, autorizan su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que conste, firman el presente informe en Lugo, a 1 de Junio de 2012.

Fdo. M<sup>a</sup> Isabel Quiroga Berdeal  
Profesora Titular de Universidad

Fdo. Ysabel Santos Rodríguez  
Profesora Titular de Universidad



El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido parcialmente  
financiado por los proyectos de la Xunta de Galicia:

INCITE IN845B-2010/089

PGIDIT 05RMA002E

PGIDIT 07MMA012CT

PGIDIT 08MMA011200PR



*-¿Querrías decirme, por favor, a dónde tendré que ir desde aquí?*

*-Eso dependerá exactamente del sitio a donde quieras llegar.*

Carroll Lewis

“Alicia en el País de las Maravillas”

A mis padres

A Beti, Luis y Andrea

A Lorena



## **AGRADECIMIENTOS**

Estos agradecimientos, aunque parezca mentira, me ha llevado mucho tiempo escribirlos. La principal razón es que no encontraba la inspiración, pero no la inspiración para escribir palabras que suenen bien, o que queden bonitas, sino las palabras que sean capaces de transmitir el profundo y más sincero agradecimiento, y sobre todo que sean capaces de hacer que sintáis de veras que os estoy eternamente agradecido.

Desde luego son muchas las personas que han contribuido a que esté hoy donde estoy, todos ellos de forma consciente o inconsciente han participado con su ayuda, ánimo y comprensión a que esta tesis haya llegado a su término. Por todo lo que han hecho por mí a lo largo de esta larga etapa me gustaría desde aquí hacer público mi agradecimiento:

A José M<sup>a</sup> Nieto por darme la oportunidad de poder trabajar con este grupo de investigación, que más que un grupo de trabajo es una familia.

A Maribel porque ha confiado en mí incluso cuando todo indicaba que no era buena idea, espero que no te arrepientas por ello, porque ha tenido toda la paciencia, porque ha sufrido tanto o incluso más que yo, y porque sé que se ha desgastado y vaciado completamente para que este trabajo llegara hasta el final. Muchas gracias.

## *Agradecimientos*

---

A Ysabel Santos y a toda su familia; Manu, Adriana, Paula y Dani, que me abrieron no solo las puertas de su laboratorio sino también las de su casa, compartiendo trabajo, comidas, cenas y largas madrugadas; sin su ayuda y apoyo esta tesis no sería posible.

A la empresa Stolt Sea Farm S.A. y especialmente a Ana Rianza e Isabel Ferreiro por su ayuda y colaboración.

A Nuria porque es una de las principales “culpables” de que haya podido formar parte de este grupo de gente. Fue la primera persona que me animó a embarcarme en este viaje investigador y por esta razón de ella puedo decir que ha estado desde el principio hasta hoy mismo y no dudo de que lo estará siempre.

A Roberto, por todas esas risas en el trabajo, en los congresos, en los numerosos viajes que hemos hecho juntos, por su gran corazón y por estar dispuesto a ayudar en todo momento y a cualquier hora, dejando incluso sus ocupaciones para echar una mano. Lo he comprobado y me lo ha demostrado muchas veces, sobre todo en esta última fase cuando las cosas parece que se hacen más difíciles, muchas gracias.

A Ana, por su ayuda y sus consejos ya no solo en el plano laboral sino también en el plano personal. Por estar ahí a mi lado todos los días y en todo momento, han sido muchas la cosas que hemos vivido juntos, desde los muestreos en Ribeira, pasando por numerosos cursos y congresos, compartiendo malos y buenos

momentos. Por no escatimar en explicaciones y compartir conmigo todo lo que sabe. Por apreciar y valorar mi esfuerzo. Por las risas diarias y el buen ambiente. Se puede decir que hemos sufrido procesos paralelos en nuestras tesis, espero que pronto tu también puedas presentar la tuya. Este trabajo no habría salido a flote sin tu desinteresada ayuda.

A todos los chicos, Germán, Manuela, Paolo, Rita y Sandra con vosotros he pasado gran parte del día a día y he compartido mis alegrías y tristezas, gracias por hacer que cada día sea un gran día, por hacer que las cosas sean más fáciles, por todos los buenos momentos vividos, tanto en el trabajo como fuera. Siempre dispuestos a hacer más llevadero el trabajo a ayudar en todo momento, sin prisas de ningún tipo. Pero también por esas partidas de pinponazo, el vóley, los partidos de Champions con unas pizzas, el Mundial de fútbol, los momentos de charlas en los pasillos, las necropsias que acababan con manguerazos de agua. Gracias a vosotros todos los días son especiales.

A Andrés, Fabry y Paulo ya que, como todos sabemos, los inicios nunca son fáciles y ellos han estado ahí al principio y lo siguen estando, apoyándome y ayudándome a pesar de que ahora nos separan muchos kilómetros de distancia. Estoy seguro de que desde la distancia también se alegran por mi.

A Mónica y a Sonia por ayudarme cada día, por pararse a explicarme y perder su tiempo para que yo aprenda y me forme, por su buen humor y por hacerme sentir uno más desde el primer día.

## *Agradecimientos*

---

A Meli ya que con ella aprendí desde el primer momento en que pisé el laboratorio, me ayudó a integrarme en el grupo, sobre todo porque sin su trabajo el nuestro no sería posible y por estar siempre dispuesta a echar una mano.

A mis amigos de Lalín, no me quiero olvidar de ninguno, Martín, Félix, Juan, Álex, Piñi, Santi, Miguel Pajarín, Nachete, Chiro, Niní, Paco, Pampín, Javichu, Jesús, todos ellos han estado muy pendientes y preocupados no sólo en esta última etapa sino también durante los duros años de la carrera.

A mis padres porque siempre estaré en deuda con ellos, desde el principio creyeron en este proyecto y confiaron en mí sin dudarlo y han tenido toda la paciencia necesaria, porque no han escatimado en esfuerzos para que yo pudiera cumplir este sueño, porque lo han dado todo por mí y lo siguen dando privándose ellos para que a mi no me falte de nada, y porque los quiero mucho.

A Beti, Luis y Andrea, por su apoyo y su cariño desinteresado, porque además han sufrido tanto como yo sobre todo esta última etapa que ha sido para ellos incluso más larga que para mí.

A Lorena se lo debo todo, sé que sólo con estas palabras no es suficiente para agradecerle todo lo que ha hecho, hace y hará por mí. Sin duda ha sufrido todos los estados de ánimo por los que he pasado a lo largo de esta larga etapa y los ha vivido en sus propias carnes, por sufrirme día a día, por animarme a seguir, por

apoyarme en todo, por sus consejos, por su tiempo y por aguantarme incluso cuando ni yo mismo me aguantó, sobre todo en esta parte final, en la que parecía que no se iba a acabar nunca.

A la familia de Lore: Rafa, Isa, Javi, Erika, Adriana y Natalia, se que han sufrido por mí, han sufrido por lo que Lore sufría por mí y han estado ahí siempre ayudando en todo momento con palabras de ánimo. Muchas gracias.

A los amigos que he conocido a lo largo de mi carrera sobre todo y en especial a Anabel, Antonio, Carmen, Eusebio, Juanchu, Laura, Pau y Tomás, que siempre me han apoyado y me han dado buenos consejos y muchos ánimos, se que para ellos también es un motivo de alegría que finalice esta etapa.

A Ángel, M<sup>a</sup> Jesús, Elena y Celia por haberme acogido siempre con tanto cariño, por haberme enseñado tantas cosas, no solo como veterinario, sino también como amigo, por haber sido de las personas que más han despertado en mí la inquietud por la veterinaria todos esos veranos de prácticas que me ayudaron y motivaron para poder acabar mi carrera, porque nunca escatimaron en explicaciones, tiempo, ni atención y porque siempre me han aconsejado en todo, haciéndome ver todas las caras, tanto buenas como malas de las cosas.

A los chicos del laboratorio de Ysa: Alba, Cristina, Edgar, Maxi, Naiara y Paula, que desde el primer momento me ayudaron a sentirme como uno más, como en casa.

## *Agradecimientos*

---

Aunque por momentos pensé que no sería capaz, gracias a vosotros ha sido posible, todos formáis parte de esto, habéis aportado un trozo de este trabajo, por lo que este logro es también mérito vuestro, así lo siento y así espero que lo sintáis también vosotros. A todos vosotros mi más sincero y sentido agradecimiento.

---

|  |     |
|--|-----|
| ABREVIACIONES.....   | xxi |
| CAPÍTULO 1. Introducción general.....                                      | 1   |
| 1.1. El rodaballo .....  | 3   |
| 1.2. El lenguado.....  | 7   |
| 1.3. Principales enfermedades del rodaballo y del lenguado en cultivo..... | 10  |
| 1.4. La piel.....  | 19  |
| 1.5. La tenacibaculosis .....  | 27  |
| 1.5.1. Introducción histórica.....   | 27  |
| 1.5.2. Taxonomía de la Familia Flavobacteriaceae.....                      | 30  |
| 1.5.3. Transmisión y reservorio.....                                       | 32  |
| 1.5.4. Rango de hospedadores y distribución geográfica....                 | 34  |
| 1.5.5. Métodos de diagnóstico.....   | 35  |
| 1.5.6. Respuesta del hospedador .....                                      | 37  |
| 1.5.7. Respuesta inmunitaria innata y adquirida .....                      | 38  |
| CAPÍTULO 2. Objetivos .....  | 43  |
| CAPÍTULO 3. Materiales y métodos generales .....                           | 47  |
| 3.1. Procedencia de los peces .....  | 49  |
| 3.2. Instalaciones .....   | 50  |
| 3.3. Infección experimental.....   | 51  |
| 3.4. Toma de muestras de los ejemplares.....                               | 52  |
| 3.5. Estudio microbiológico .....  | 54  |
| 3.6. Procesado de muestras para microscopía óptica y electrónica .....     | 55  |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.7. Técnicas de tinción .....  | 56        |
| 3.8. Técnicas inmunohistoquímicas.....  | 57        |
| 3.9. Análisis de imágenes .....   | 58        |
| 3.10. Estudios hematológicos .....  | 59        |
| 3.11. Análisis estadístico .....  | 59        |
| <b>CAPÍTULO 4. Morphological, immunohistochemical and<br/>ultrastructural characterization of the skin of turbot .....</b>  | <b>61</b> |
| 4.1. Introduction .....   | 63        |
| 4.2. Materials and methods.....   | 65        |
| 4.2.1. Fish .....   | 65        |
| 4.2.2. Light microscopy .....   | 65        |
| 4.2.3. Transmission and scanning electron microscopy<br>(TEM and SEM).....  | 66        |
| 4.2.4. Immunohistochemistry .....   | 67        |
| 4.3. Results .....  | 69        |
| 4.4. Discussion.....  | 80        |
| 4.5. References .....   | 84        |
| <b>CAPÍTULO 5. Morphopathological features of a severe ulcerative<br/>disease outbreak associated with <i>Tenacibaculum maritimum</i> in<br/>cultivated sole, <i>Solea senegalensis</i> (L.).....</b> | <b>89</b> |
| 5.1. Introduction .....   | 91        |
| 5.2. Materials and methods.....   | 92        |
| 5.2.1. Sampling of diseased fish.....   | 92        |
| 5.2.2. Isolation and identification of bacteria .....   | 93        |

---

|  |     |
|--|-----|
| 5.2.3. Nested PCR-detection of <i>Tenacibaculum maritimum</i> in fish tissues .....  | 94  |
| 5.2.4. Histopathological examination.....  | 94  |
| 5.3. Results .....   | 95  |
| 5.3.1. Description of the outbreak.....  | 95  |
| 5.3.2. Bacterial characterization and PCR detection in fish tissues .....  | 95  |
| 5.3.3. Macroscopic observations.....   | 96  |
| 5.3.4. Light microscopic observations .....  | 98  |
| 5.3.5. Scanning electron microscopy .....  | 100 |
| 5.4. Discussion .....  | 102 |
| 5.5. References .....  | 106 |
| <br>   |     |
| CAPÍTULO 6. Immunohistochemical diagnosis of tenacibaculosis in paraffin embedded tissues of Senegalese sole ( <i>Solea senegalensis</i> ) ..... | 111 |
| 6.1. Introduction .....  | 113 |
| 6.2. Materials and methods .....   | 115 |
| 6.2.1. Experimental infection .....  | 115 |
| 6.2.1.1. Bacteria .....  | 115 |
| 6.2.1.2. Source of antibody .....  | 115 |
| 6.2.1.3. Challenge procedure.....  | 116 |
| 6.2.1.4. Samples for microbiological, PCR and histopathological studies. ....  | 117 |
| 6.2.2. Natural outbreaks .....   | 118 |
| 6.2.3. Immunohistochemistry.....   | 118 |

|  |     |
|--|-----|
| 6.3. Results .....   | 121 |
| 6.3.1. Experimental infection .....  | 121 |
| 6.3.1.1. Macroscopic, microbiological and<br>histopathological findings.....   | 121 |
| 6.3.1.2. Immunohistochemistry .....  | 122 |
| 6.3.2. Natural outbreak .....  | 124 |
| 6.4. Discussion.....   | 129 |
| 6.5. References .....  | 132 |
| CAPÍTULO 7. Pathology and immunohistochemistry in turbot<br>after experimental infection with <i>Tenacibaculum maritimum</i> . |     |
| 7.1. Introduction .....  | 141 |
| 7.2. Materials and methods.....  | 142 |
| 7.2.1. Fish .....  | 142 |
| 7.2.2. Experimental procedure.....   | 143 |
| 7.2.3. Bacteriological isolation .....   | 144 |
| 7.2.4. Histological and immunohistochemistry studies....   | 144 |
| 7.3. Results .....   | 145 |
| 7.3.1. Bacterial isolation.....  | 145 |
| 7.3.2. Clinical signs and gross lesions .....  | 145 |
| 7.3.3. Histopathological examination and<br>immunohistochemistry .....   | 147 |
| 7.3.3.1. SC experiment .....   | 147 |
| 7.3.3.2. IP experiment.....  | 152 |

---

|  |     |
|--|-----|
| 7.4. Discussion .....  | 156 |
| 7.5. References .....  | 159 |
| CAPÍTULO 8. Evaluation of immune response in turbot ( <i>Psetta maxima</i> L.) tenacibaculosis: haematological and immunohistochemical studies ..... | 165 |
| 8.1. Introduction .....  | 167 |
| 8.2. Materials and methods .....   | 169 |
| 8.2.1. Fish .....  | 169 |
| 8.2.2. Infection .....   | 169 |
| 8.2.3. Sampling procedure .....  | 169 |
| 8.2.4. Haematological studies .....  | 170 |
| 8.2.5. Histology and immunohistochemistry .....  | 170 |
| 8.2.6. Quantitative analysis of Ig <sup>+</sup> cells .....  | 171 |
| 8.2.7. Statistics .....  | 172 |
| 8.3. Results .....   | 173 |
| 8.3.1. Histopathology .....  | 173 |
| 8.3.2. Haematological values .....   | 173 |
| 8.3.3. Morphology of Ig <sup>+</sup> cells .....   | 174 |
| 8.3.4. Kinetics of Ig <sup>+</sup> cells .....   | 178 |
| 8.3.5. Localization of Ig <sup>+</sup> cells within organs .....   | 181 |
| 8.3.5.1. Spleen .....  | 181 |
| 8.3.5.2. Kidney .....  | 182 |
| 8.3.5.3. Intestine .....   | 182 |
| 8.3.5.4. Thymus .....  | 182 |

|   |     |
|---|-----|
| 8.3.5.5. Skin.....                                      | 183 |
| 8.4. Discussion.....                                    | 184 |
| 8.5. References .....                                   | 190 |
| CAPÍTULO 9. Resultados y discusión general .....        | 197 |
| CAPÍTULO 10. Conclusiones.....                          | 219 |
| CAPÍTULO 11. Referencias bibliográficas generales ..... | 225 |
| CAPÍTULO 12. Resumen.....                               | 255 |

## ABREVIACIONES

**Anti-Tm:** anticuerpo purificado anti-*Tenacibaculum maritimum* cepa LL01.8.3.8.

**BPN:** “black patch necrosis”

**CMM:** centro de melanomacrófagos

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**dpi:** días post inoculación

**ECP:** productos extracelulares

**FKC:** “formalin killed cells”

**FMM:** medio de *Flexibacter maritimus*

**H-E:** hematoxilina-eosina

**hpi:** horas post inoculación

**LCDV:** virus de la enfermedad del linfocistis

**LLD:** lateral line depigmentation

**MA:** agar marino

**MMC:** centro de melanomacrófagos

**IHC e IHQ:** inmunohistoquímica

**IP:** intraperitoneal

**IPNV:** virus de la necrosis pancreática infecciosa

## *Abreviaciones*

---

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**SC:** subcutáneo

**SD:** desviación estándar

**SEM:** microscopía electrónica de barrido

**TCBS:** tiosulfato citrato bilis sacarosa

**TEM:** microscopía electrónica de transmisión

**TSA-1:** agar de soja tripticaseína suplementado con 1% de NaCl

**VEN:** necrosis viral eritrocítica

**VHSV:** virus de la septicemia hemorrágica viral

**CAPÍTULO 1.**  
**INTRODUCCIÓN GENERAL**



## 1.1. EL RODABALLO

El rodaballo (*Psetta maxima*, L.) (Figura 1) es un pez teleósteo plano marino que pertenece al Orden Pleuronectiformes, Familia Scophthalmidae. Esta especie bentónica en vida silvestre reposa sobre fondos arenosos,



---

**Figura 1.** Fotografía de rodaballo.

---

pedregosos o mixtos a una profundidad de entre 20 y 75 m. Se distribuye por el Mar Báltico, Mar del Norte, Canal de la Mancha, Océano Atlántico nororiental hasta Marruecos, Mar Mediterráneo y Mar Negro. Los machos tienen un ritmo de crecimiento más lento y alcanzan menor tamaño que las hembras. La madurez sexual tiene lugar durante el cuarto o quinto año de vida. Los peces en estado salvaje se alimentan principalmente de otros peces de menor tamaño, pero también comen crustáceos y moluscos. El cuerpo de los ejemplares adultos no presenta simetría bilateral y su morfología es redondeada y aplanada. Los ojos se sitúan sobre el costado izquierdo, la boca es de gran tamaño con una mandíbula prominente y una dentición igual a ambos lados. En la parte superior del cuerpo muestra una coloración marrón parduzca más o menos oscura, que varía según el entorno en el que viva, mientras que el flanco inferior carece de pigmentación. Esta especie no posee escamas pero en su

defecto presenta una serie de tubérculos óseos que hacen que la superficie de la piel sea rugosa.

El cultivo comienza con la obtención de los gametos en los criaderos para conseguir las larvas después de un periodo de incubación de entre cinco a siete días. En esta primera fase las condiciones de cría están estrictamente controladas. Durante el primer mes de vida en cultivo, las larvas se alimentan de organismos vivos como rotíferos y artemia, pasando posteriormente a una alimentación a base de piensos fabricados con ingredientes principalmente marinos. Generalmente, los rodaballos alcanzan un tamaño comercial de 2 kg en menos de 24 meses. El rodaballo se explota de forma intensiva en granjas situadas en zonas costeras, generalmente empleando tanques de forma circular. No obstante, existen otras técnicas de cultivo que están menos extendidas como son el cultivo en jaulas flotantes. La Figura 2 muestra los estadios de desarrollo del rodaballo en cultivo.

Aunque sí son relevantes las importaciones de rodaballo de la pesca extractiva procedentes de Europa, principalmente desde los Países Bajos, la cantidad de rodaballo silvestre capturada por la flota española es cada vez más escasa y testimonial en los mercados (55 t en 2008), por lo que la cría en granjas acuícolas de esta especie es una alternativa real.

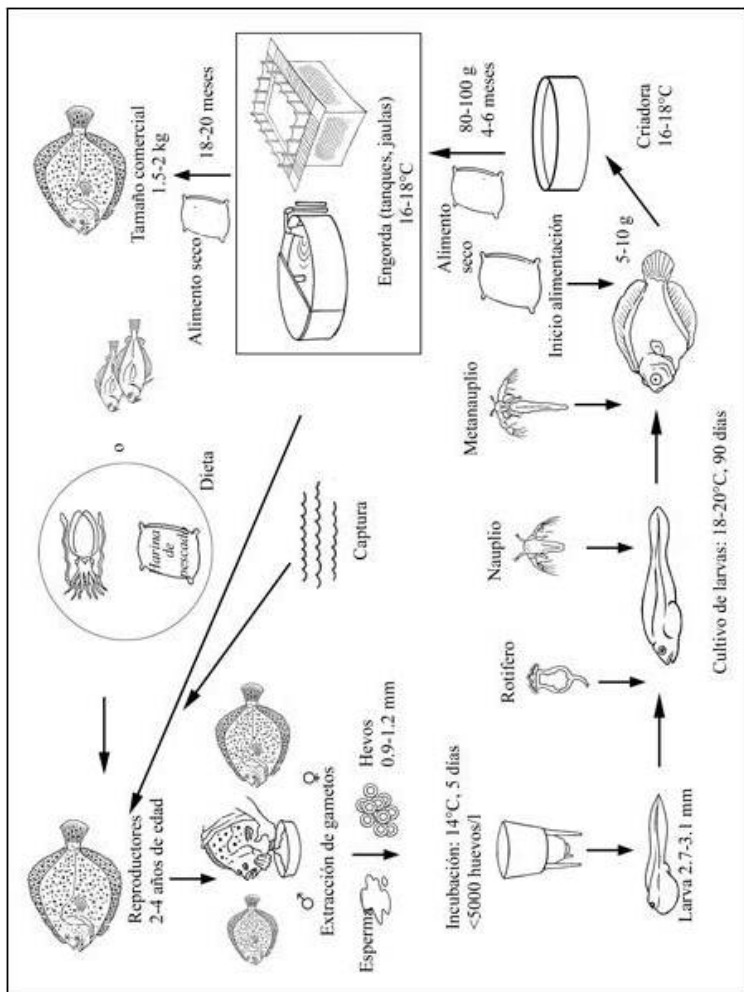


Figura 2. Ciclo de desarrollo del rodaballo en cultivo (FAO 2011).

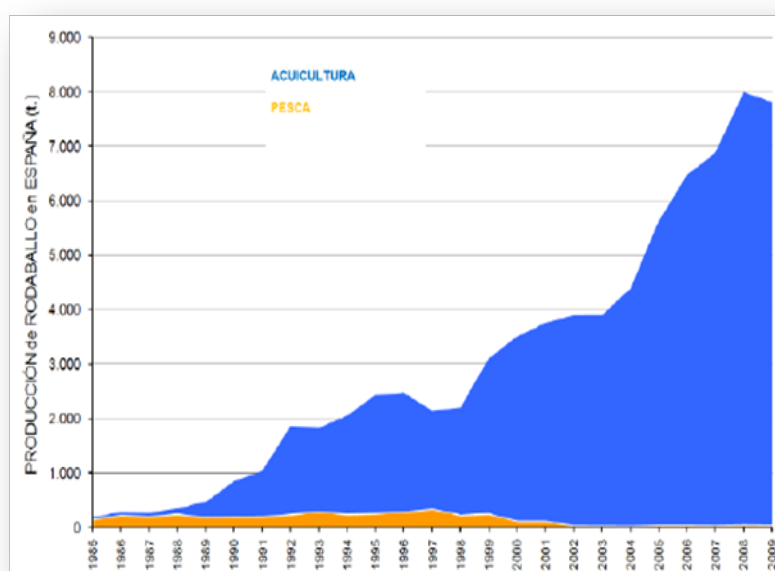
La producción de rodaballo de acuicultura en España se ha visto notablemente incrementada desde la década de los 80 hasta el año 2009 (Tabla 1, Figura 3) y, actualmente, supone más del 99% de la producción total de esta especie en Europa. La producción total de rodaballo en nuestro país en el año 2010 ha sido de 6910 t (APROMAR 2011) (Tabla 1, Figura 3), un 16,9% inferior a la del 2009. A la luz de estos datos se constata que España es el principal productor europeo de rodaballo y el segundo a nivel mundial sólo superado por China (FAO 2010).

En la suma total de la producción del territorio nacional Galicia es, con diferencia, la principal Comunidad Autónoma productora de rodaballo. Esto es debido a que Galicia presenta un litoral idóneo para el cultivo de esta especie a escala industrial gracias a las características de temperatura y calidad de sus aguas, y a la facilidad de introducción de este producto en el mercado nacional y europeo (Devesa 1996, González Laxe y col. 2004).

| Rodaballo         | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 |
|-------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <b>Asturias</b>   | 80   | 50   | 50   | 60   | 65   | 0    | 0    | 0    |
| <b>Cantabria</b>  | 120  | 125  | 150  | 140  | 215  | 280  | 250  | 200  |
| <b>Galicia</b>    | 2740 | 3650 | 3790 | 5365 | 5725 | 7510 | 8070 | 6710 |
| <b>País Vasco</b> | 500  | 431  | 285  | 270  | 75   | 80   | 0    | 0    |
| <b>Total</b>      | 3440 | 4256 | 4275 | 5835 | 6080 | 7870 | 8320 | 6910 |

**Tabla 1.** Evolución de la producción de rodaballo (t) en España durante el período 2003-10 (APROMAR 2010, 2011).

Los datos de producción atestiguan que la acuicultura de esta especie es un sector económico plenamente consolidado en nuestra Comunidad Autónoma. De esta forma, en el año 2010, Galicia aglutinó el 97% de la producción nacional de rodaballo (6710 t), seguida a gran distancia por Cantabria con tan solo el 3 % (200 t) (Tabla 1).



**Figura 3.** Evolución de las fuentes de obtención de rodaballo en España: acuicultura y pesca extractiva, para el período 1985-2009 (APROMAR 2011).

## 1.2. EL LENGUADO

El lenguado *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) (Figura 4) es un pez teleosteo plano marino que pertenece al Orden Pleuronectiformes, Familia Soleidae. Se distribuye por las costas del Atlántico

Europeo desde el norte al sur pasando por el este, y también, aunque menos frecuente, en el Mar Mediterráneo. Presenta una forma oval y un cuerpo asimétrico de color entre marrón verdoso oscuro o marrón rojizo claro, aunque es capaz de adaptarse miméticamente al color del fondo.

Es un pez bentónico que habita en aguas de entre 12 y 65 m de profundidad, descansando sobre fondos arenosos o fangosos. Puede llegar a medir 60 cm de longitud y pesar 800 g. Es un depredador de hábitos



---

**Figura 4.** Fotografía de lenguado.

---

básicamente nocturnos y se alimenta principalmente de anélidos y moluscos. Alcanza la madurez sexual entre el tercer y cuarto año de vida con unos 25-30 cm de longitud. La puesta se realiza entre los meses de marzo o abril pero se puede retrasar hasta el mes de junio. La hembra puede llegar a poner un millón de óvulos por kg de peso (Arellano y Sarasquete 2006).

El cultivo del lenguado está muy poco extendido hasta el momento debido a la falta de información acerca de su reproducción y exigencias de cultivo. Sin embargo, actualmente, está siendo estudiado en profundidad debido a su enorme interés económico-comercial (Arellano y Sarasquete 2006) depositándose grandes expectativas en su cultivo industrial.

Buena prueba de que el lenguado es una de las especies más prometedoras en la acuicultura española, son los datos de producción (Tabla 2) y de facturación total resultante de la comercialización en primera venta del lenguado de crianza de talla comercial desde el año 2004. Así, en el año 2010 se produjeron 204 t, observándose un incremento progresivo de la producción (272%) con respecto al año 2004, donde sólo se obtuvieron 75 t (APROMAR 2009). Aunque este incremento refleja un evidente avance en las técnicas de cultivo y una apuesta firme por parte de los productores para diversificar la oferta de acuicultura con esta nueva especie, diversas cuestiones técnico-productivas y administrativas continúan frenando la producción del lenguado a escala industrial. De hecho, en el año 2009 se produjeron sólo 188 de las 421 t previstas, lo que supuso una variación del 33,2% con respecto al año 2008 (APROMAR 2009, 2010). En cuanto a la facturación total resultante de la comercialización del lenguado de talla comercial, ésta ascendió a 2,1 millones de euros en el 2010 (APROMAR 2011).

Con respecto a la producción por Comunidades Autónomas, Galicia se situó en el 2010 como el principal productor de esta especie alcanzando las 170 t de producto final (APROMAR 2011), seguida a gran distancia por Canarias (30 t) y Andalucía (4 t). La producción de lenguado de cultivo se desarrolla en Galicia en las mismas empresas que producen rodaballo.

| Lenguado  | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 |
|-----------|------|------|------|------|------|------|------|
| Andalucía | 31   | 20   | 55   | 24   | 10   | 10   | 4    |
| Canarias  | 0    | 0    | 0    | 6    | 15   | 28   | 30   |
| Galicia   | 17   | 20   | 0    | 30   | 30   | 150  | 170  |
| Murcia    | 27   | 20   | 25   | 0    | 0    | 0    | 0    |
| Total     | 75   | 60   | 80   | 60   | 55   | 188  | 204  |

**Tabla 2.** Evolución de la producción de lenguado (t) en España durante el período 2004-2010 (APROMAR 2011).

### 1.3. PRINCIPALES ENFERMEDADES DEL RODABALLO Y DEL LENGUADO EN CULTIVO

Las condiciones de cultivo a las que son sometidos los peces suponen una elevada concentración de individuos en cada tanque, por lo que los animales sufren estados de estrés agravados, en algunos casos, por el manejo. Debido a estas circunstancias, los animales de cultivo desarrollan enfermedades que no habían sido descritas hasta ahora y que son resumidas en las Tablas 3 y 4. Entre las enfermedades infecciosas que afectan al rodaballo en cultivo destacan, por su repercusión, las causadas por bacterias Gram-negativas pertenecientes a los géneros *Vibrio*, *Listonella*, *Aeromonas* y *Tenacibaculum* y la bacteria Gram-positiva *Mycobacterium marinum* (Tabla 3).

La vibriosis provocada por *Listonella (Vibrio) anguillarum* (serotipos O1 y O2) posee una amplia distribución y afecta a

numerosas especies de peces. Los animales afectados por vibriosis clásica muestran signos típicos de septicemia con hemorragias en la base de las aletas, exoftalmia y opacidad corneal (Toranzo y col. 2005).

*Aeromonas salmonicida* es el agente causal de la furunculosis. La forma típica de furunculosis provoca septicemia hemorrágica de curso agudo. Esta enfermedad podría convertirse en factor limitante para la supervivencia de ciertas especies de peces amenazadas (Toranzo y col. 2005).

La edwardsiellosis, causada por *Edwardsiella tarda*, ha provocado elevadas pérdidas económicas en el cultivo de rodaballo, en el norte y en el sur de Europa en los últimos años. En el año 2005 se registraron cuatro brotes de la enfermedad en estas regiones y tres picos de mortalidad en un intervalo de un mes en el norte de Europa en 2006 (Castro y col. 2006, Padrós y col. 2006).

La tenacibaculosis, causada por *Tenacibaculum maritimum*, es una de las infecciones bacterianas más peligrosas que limita el cultivo de muchas especies de valor comercial (Avendaño-Herrera y col. 2006a). Las principales lesiones son de tipo necrótico-ulcerativo y se localizan en la piel del cuerpo, cabeza y aletas principalmente (van Gelderen y col. 2011). Además, está considerado como el principal patógeno en la producción comercial de rodaballo provocando una gran mortalidad e

importantes pérdidas económicas (Avendaño-Herrera y col. 2006b).

Entre los géneros virales que incluyen patógenos de interés para los cultivos de rodaballo se encuentran los géneros *Aquabirnavirus*, *Paramyxovirus* y *Novirhabdovirus*.

El género *Aquabirnavirus*, incluye al virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), una enfermedad de declaración obligatoria en la Unión Europea causante de grandes pérdidas económicas en cultivos de peces salmónidos. Aunque los aislados de IPNV obtenidos a partir de rodaballo cultivado en España provenían de animales asintomáticos, estos peces representan un riesgo para los cultivos de otras especies susceptibles al actuar como reservorios de la infección, pudiendo contagiar la enfermedad y provocar mortalidades que, en ocasiones, alcanzan el 70% (de las Heras y col. 2010).

*Paramyxovirus* produce elevadas mortalidades aunque los casos son muy esporádicos y afectan sólo a algunas plantas de cultivo (Toranzo y col. 1997). Además, en los últimos años no se han descrito nuevos casos en rodaballo.

El virus de la septicemia vírica hemorrágica (VHSV), miembro del género *Novirhabdovirus*, es un agente infecto-contagioso que provoca un proceso septicémico-hemorrágico que, en ocasiones, puede cursar también con signos neurológicos. Es una enfermedad de declaración obligatoria en la Unión Europea que

supuso un fuerte impacto en el desarrollo de la acuicultura del rodaballo en Gran Bretaña (Snow y col. 2005) y, en los últimos años, se ha aislado en más de 50 especies diferentes en Norteamérica, Asia y Europa (Gómez-Casado y col. 2011).

Entre las enfermedades parasitarias que afectan al rodaballo cabe destacar la enteromixosis intestinal causada por *Enteromyxum scophthalmi* que causa importantes pérdidas en rodaballos de cultivo (Bermúdez y col. 2010). La enfermedad se caracteriza por emaciación y caquexia así como por enteritis catarral severa (Bermúdez y col. 2006, Bermúdez y col. 2010).

Asimismo, *Philasterides dicentrarchi* es un parásito ciliado que causa graves lesiones ulcerativas cutáneas y posee la capacidad de alcanzar el torrente sanguíneo y provocar un cuadro de sepsis (Iglesias y col. 2001, Ramos y col. 2007).

Las enfermedades causadas por diferentes especies de amebas provocan lesiones branquiales con la consiguiente dificultad respiratoria en los ejemplares afectados (Dykova y col. 1998, 1999, 2000).

En infecciones leves, los peces afectados por *Trichodina* spp. no muestran manifestaciones clínicas, pero en infestaciones graves las mortalidades pueden alcanzar valores muy elevados (Novoa y col. 1992, Álvarez-Pellitero 2004).

## Introducción general

---

Debido a que la producción intensiva de lenguado es muy reciente, hasta el momento se conocen pocas enfermedades asociadas al cultivo de esta especie y la bibliografía al respecto es escasa. Buena parte de las mismas son patologías descritas previamente en otras especies (dorada, lubina y rodaballo), lo que hace suponer que en el futuro pueda ampliarse sustancialmente su número en el lenguado, especialmente si éste es producido junto a estas otras especies sin adoptarse las medidas preventivas adecuadas. Los principales problemas patológicos detectados hasta el momento han sido los de tipo bacteriano, observándose diferencias en la etiología de las infecciones según el área geográfica.

| AGENTE   | TIPO                  | CUADRO CLÍNICO Y/O LESIONAL   | REFERENCIAS   |
|--|-----------------------|---|---|
| <i>Amoeba</i> spp.<br><i>Neoparamoeba</i> spp. | Ectoparásitos         | Branquitis; dificultad respiratoria.  | Dykova y col. 1998, 1999, 2000  |
| <i>Trichodina</i> spp.                         | Ectoparásito          | Letargia; dificultad respiratoria; sin manifestación clínica en infecciones leves                 | Novoa y col. 1992, Álvarez-Pellitero 2004   |
| <i>Philasterides dicentrarchi</i>              | Ecto,<br>Endoparásito | Úlceras cutáneas, alteración de la natación; exoftalmia; distensión abdominal; elevada mortalidad | Iglesias y col. 2001, 2003, Álvarez-Pellitero y col. 2004a, Puig y col. 2007, Ramos y col. 2007 |
| <i>Tetramicra brevifilum</i>                   | Endoparásito          | Degeneración muscular   | Estévez y col. 1992, Leiro y col. 2001  |
| <i>Cryptosporidium scophthalmi</i>             | Endoparásito          | Degeneración y desprendimiento del epitelio intestinal, posible inmunosupresor                    | Álvarez-Pellitero y col. 2004b, 2009  |

|  |              |   |  |
|--|--------------|---|--|
| <i>Enteromyxum scophthalmi</i>   | Endoparásito | Elevada mortalidad; caquexia; enteritis catarral severa   | Branson y col. 1999, Palenzuela y col. 2002, Redondo y col. 2004, Bermúdez y col. 2010   |
| <i>Tenacibaculum maritimum (Flexibacter maritimus)</i>                                   | Bacteria     | Erosiones y úlceras cutáneas; cuadro septicémico  | Pazos y col. 1993, Handlinger y col. 1997, Santos y col. 1999, Avendaño-Herrera y col. 2004, Santos 2005, Toranzo y col. 2005, van Gelderen y col. 2011, Vilar y col. 2012 |
| <i>Aeromonas salmonicida</i>   | Bacteria     | Úlceras cutáneas; necrosis licuefactiva en riñón y bazo, cuadro septicémico                               | Toranzo y Barja 1992, Pedersen y col. 1994, Larsen y Pedersen 1996, Santos 2005, Toranzo y col. 2005, Millán y col. 2011   |
| <i>Listonella anguillarum (Vibrio anguillarum), Listonella pelagia (Vibrio pelagius)</i> | Bacteria     | Hemorragias en la base de las aletas; erosiones cutáneas; exoftalmia; letargia                            | Horne y col. 1977, Toranzo y col. 1997, 2005, Villamil y col. 2003   |
| <i>Edwardsiella tarda</i>  | Bacteria     | Exoftalmia y tumefacción periocular; hemorragias en diferentes órganos; ascitis; abscesos en riñón y bazo | Castro y col. 2006, Padrós y col. 2006, Noga 2010  |
| <i>Mycobacterium marinum</i>   | Bacteria     | Granulomas en bazo, riñón e hígado  | Santos y col. 2002, Toranzo y col. 2005  |
| Virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV)  | Virus        | Exoftalmia; oscurecimiento cutáneo; hemorragias; anemia   | Snow y Smail 1999, King y col. 2001, Brudeseth y col. 2005, Snow y col. 2005   |
| Virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV)                                       | Virus        | Necrosis pancreática  | Novoa y col. 1995, Cutrin y col. 2005  |
| <i>Paramyxovirus</i> spp.  | Virus        | Hemorragias; elevada mortalidad   | Toranzo y col. 1997  |

**Tabla 3.** Enfermedades infecciosas y parasitarias que afectan al rodaballo.

En los cultivos de lenguado del área mediterránea destacan la pasteurelisis y la tenacibaculosis, asociadas o no a brotes de vibriosis causadas por *L. anguillarum* (serotipos O1 y O2), *Vibrio harveyi* y *Vibrio alginolyticus* y más ocasionalmente por *Listonella pelagia* (Zorrilla y col. 1999, Cepeda y Santos 2002, Rico y col. 2008, López y col. 2010).

La pasteurelisis, causada por *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, afecta especialmente al lenguado cuando las temperaturas son superiores a los 18°C (Zorrilla y col. 1999) y se caracteriza por presentar cuadros agudos muy severos en los que la mortalidad puede llegar a ser extremadamente alta.

La tenacibaculosis, causada por *Tenacibaculum maritimum* (*Flexibacter maritimus*) y *Tenacibaculum soleae* (Cepeda y Santos 2002, Cepeda y col. 2003, Piñeiro-Vidal y col. 2008a, López y col. 2010), suele cursar con cuadros cutáneos ulcerativos progresivos en piel y aletas y, en algunos casos, cuadros septicémicos. En Galicia, la tenacibaculosis en algunas ocasiones está asociada con la vibriosis causada por *Vibrio splendidus* y *L. pelagia* y, ocasionalmente, por *Vibrio alginolyticus* y *V. harveyi*.

Recientemente se han descrito episodios de furunculosis (Magariños y col. 2011) y edwardsiellosis (Castro y col. 2012) en lenguado (*S. senegalensis*) cultivados en una instalación que utilizaba el mismo sistema de recirculación de agua para el cultivo de rodaballos.

Entre las enfermedades víricas, se ha descrito la existencia de la enfermedad linfoquística (forma cutánea) así como la presencia de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos en los eritrocitos de *S. senegalensis*. De momento, los estudios de microscopía electrónica no han permitido poner en evidencia la presencia de partículas víricas en los mismos, aunque tampoco se ha descartado la existencia de un cuadro similar a la necrosis viral eritrocítica (VEN) o procesos similares descritos en otras especies (Padrós y col. 2003).

Dentro de las enfermedades parasitarias externas, se han detectado infecciones por *Amyloodinium*, por *Cryptobia* spp. y por ciliados similares a *Cryptocaryon*.

Como parásitos internos se ha observado ocasionalmente la presencia de mixosporidios en túbulos renales, xenomas de *Tetramicra* y algunas larvas de trematodo digénico enquistadas en la musculatura (Padrós y col. 2003). Recientemente se ha descrito una nueva enfermedad parasitaria que afecta a los lenguados de cultivo y que causa lesiones en el tejido muscular, riñón, corazón, hígado y tracto digestivo (Constenla y Padrós 2010).

| AGENTE  | TIPO         | REFERENCIAS  |
|---|--------------|--|
| <i>Amyloodinium</i>   | Ectoparásito | Padrós y col. 2003   |
| <i>Cryptobia</i> spp.   | Ectoparásito | Padrós y col. 2003   |
| <i>Cryptocarion</i>   | Ectoparásito | Padrós y col. 2003   |
| Like-Amoeba   | Parásito     | Constenla y Padrós 2010  |
| <i>Tenacibaculum maritimum</i><br>( <i>Flexibacter maritimus</i> )  | Bacteria     | Cepeda y Santos 2002, Cepeda y col. 2003, Avendaño-Herrera y col. 2004, Santos 2005, Toranzo y col. 2005 |
| <i>Tenacibaculum soleae</i>   | Bacteria     | Piñeiro-Vidal y col. 2008a, López y col. 2010  |
| <i>Listonella anguillarum</i><br>( <i>Vibrio anguillarum</i> ),<br><i>Listonella pelagia</i> ( <i>Vibrio pelagius</i> ) | Bacteria     | Santos 2005, Toranzo y col. 2005   |
| <i>Vibrio harveyi</i>   | Bacteria     | Moriñigo y col. 2001   |
| <i>Aeromonas salmonicida</i>  | Bacteria     | Magariños y col. 2011  |
| <i>Edwardsiella tarda</i>   | Bacteria     | Castro y col. 2012   |
| Virus de la septicemia<br>hemorrágica viral (VHSV)  | Virus        | Toranzo y col. 2003  |
| Virus de la enfermedad del<br>linfocistis (LCDV)  | Virus        | Toranzo y col. 2003, Padrós y col. 2003; Alonso y col. 2005  |

**Tabla 4.** Enfermedades infecciosas que afectan al lenguado.

#### **1.4. LA PIEL**

La piel es el límite entre el cuerpo y el ambiente que rodea al pez. Al igual que ocurre en los vertebrados superiores, la piel de los peces tiene como función principal la protección (Tyagi y Shukla 2002), ya que el mucus secretado por las glándulas mucosas cubre el cuerpo del pez, protegiéndolo contra bacterias, hongos y otros microorganismos. La piel cumple una función importante en la reparación de heridas superficiales. Inmediatamente después de una lesión, la herida es cerrada por el mucus y las células marginales de la herida se multiplican rápidamente para formar una delgada capa protectora y, progresivamente, completar la curación de la lesión (Bonilla y col. 2008).

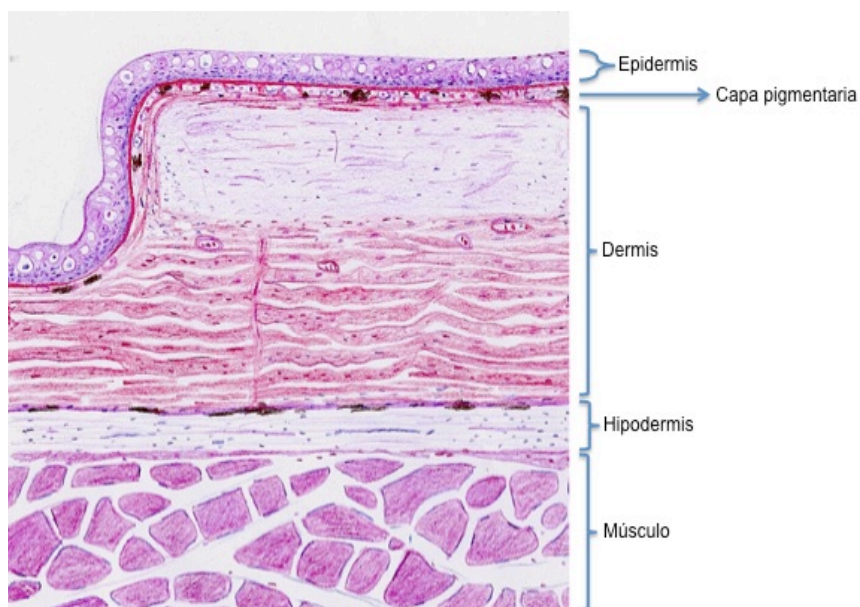
La piel es uno de los principales órganos diana de las enfermedades de los peces, razón por la cual ocupa un lugar de especial relevancia en los estudios patológicos (Ferguson 2006). Las alteraciones cutáneas pueden suponer la manifestación de una infección primaria en la piel o bien secundaria a una enfermedad sistémica (Groff 2001). Las lesiones cutáneas son importantes desde el punto de vista biológico pero además, en la práctica acuícola, reclaman una especial atención puesto que la apariencia externa del pez influye en la aceptación del producto por parte del consumidor. Debido a esta relación directa entre la salud de la piel del pez y su valor comercial, en los últimos años las empresas acuícolas están realizando verdaderos esfuerzos de cara a mejorar la calidad de la piel de los peces destinados al consumo.

## *Introducción general*

---

Previamente al estudio de las lesiones cutáneas se considera imprescindible profundizar en el conocimiento de las características de las células y estructuras de la piel sana de las diferentes especies. Además, la caracterización histológica de la estructura de la piel, permite un mejor conocimiento de los mecanismos de protección de los peces.

En general, la piel de los peces consta de tres capas: la epidermis (derivada del ectodermo embrionario), la dermis (o corion) y la hipodermis (derivadas del mesodermo) (Figura 5).



---

**Figura 5.** Dibujo de un corte transversal de piel de rodaballo (Roberto Bermúdez 2012).

---

La piel de los peces consta de un epitelio plano estratificado no queratinizado. El número de capas celulares puede variar de dos

(larvas) hasta más de 10 capas (adultos) dependiendo de la edad de los peces. En las especies pelágicas, la epidermis es frecuentemente más gruesa en las áreas dorsales del cuerpo, mientras que en las especies bentónicas la epidermis presenta mayor grosor en las superficies que cubren la parte ventral (Elliot 2000, Bonilla y col. 2008). En general, la epidermis de los peces presenta diferentes tipos de células como células epiteliales, células secretoras y células sensoriales (Grizzle y Wilmer 1976, Stone y col. 1995, Ottesen y Olafsen 1997, Elliot 2000, Webb 2000, Ferguson 2006) (Tabla 5).

Diseminadas entre las células superficiales de la epidermis se encuentran numerosas aberturas de las células mucosas que se extienden a lo largo de la epidermis. Estas células segregan el moco que cubre al cuerpo del pez. Las células mucosas también son una fuente de comunicación química entre los peces. Entre las células secretoras de la epidermis de los peces se pueden también citar las células sacciformes, las células club y las células granulares. Estos tres tipos de células secretoras realizan diferentes funciones, pero no se encuentran en todas las especies de peces (Elliot 2000) (Tabla 5).

La dermis está compuesta, en su mayoría, por tejido conjuntivo o conectivo formado por fibroblastos y fibras de colágeno. A su vez, está dividida en dos capas o estratos: el estrato esponjoso y el estrato compacto. El estrato esponjoso está formado por un tejido laxo con fibras colágenas y reticulares que confieren resistencia y consistencia, respectivamente. En el estrato

esponjoso se encuentran los cromatóforos, los bolsillos escamosos y las escamas (Tabla 5). El estrato compacto, más interno, le confiere la resistencia a la piel por la abundante presencia de fibras colágenas agrupadas de forma compacta.

Los cromatóforos están localizados en las capas pigmentarias de la piel de los peces y son las células responsables de la pigmentación. Existen varios tipos de cromatóforos en función del color de los pigmentos que se encuentran en el interior de su citoplasma, entre ellos están los melanóforos (negro o marrón), xantóforos (naranja o amarillo), eritróforos (rojos), leucóforos (plateados), iridóforos (metálicos o iridiscentes) y eritroidiridóforos (Fujii 1993, Fujii 2000, Goda y col. 2011).

Las escamas (dérmicas) de los teleósteos son placas flexibles calcificadas, cuya base se ubica en bolsillos y que se ordenan parcialmente superpuestas. La parte interna de la escama está compuesta por capas de tejido conjuntivo fibroso. El patrón de disposición de las crestas, refleja cambios en el patrón de crecimiento del individuo, razón por la cual son usadas para determinar la edad de los peces. Existen dos tipos, basados en el relieve de su superficie: ctenoideas, con dientecillos distales, y cicloideas con bordes redondeados. Ambas están siempre recubiertas por epidermis. Las escamas son el origen de muchas otras estructuras, como los radios blandos, las espinas, las placas de los Siluriformes y otros, los huesos superficiales (dérmicos) del cráneo y el opérculo (Elliot 2000).

En algunos peces, como el rodaballo, se pueden encontrar tubérculos óseos en lugar de escamas. Estas estructuras, son descritas como pequeñas placas cónicas mineralizadas que se distribuyen al azar en la cara ocular de la piel del pez. La función de estos elementos es conferir protección y resistencia a la piel del pez (Zylberberg y col. 2003).

La hipodermis separa la dermis del músculo subyacente (Le Guellec y col. 2004, Bonilla y col. 2008). Es considerada como una variante del tejido conjuntivo, especializado en el almacenamiento de lípidos. Las células principales son los adipocitos, que se encuentran en una malla de tejido conjuntivo reticular, en el cual es posible observar capilares sanguíneos (Tabla 5). Esta capa es el escenario de procesos infecciosos de diferentes tipos como bacterianos y micóticos (Ferguson 2006). Ciertas extensiones de la piel como las barbas y bigotes poseen funciones muy específicas, generalmente sensitivas y de protección. Entre los órganos con función sensitiva en los peces, cabe destacar el sistema de la línea lateral, el cual está presente en todos los peces. Este sistema realiza funciones mecano-receptoras que permiten al pez responder a los movimientos del agua a distancias relativamente cortas. Además, les permite detectar, mediante los movimientos del flujo de agua, la presencia de presas o depredadores y también de obstáculos en el medio ambiente acuático que los rodea (Elliot 2000).

Las capas epidérmica, dérmica e hipodérmica pueden mostrar diferencias dependiendo de factores como estación del año,

nutrición, calidad del agua y área de la piel, entre otras (Groff 2001).

En peces salmónidos se ha estudiado en profundidad la piel en condiciones normales así como los efectos que sobre ella ejercen los microorganismos patógenos y los agentes físico-químicos (Blazer y col. 1997, Ferguson y col. 2006, Bruno y col. 2007). Sin embargo, son escasos los estudios realizados con peces marinos de interés comercial a pesar de su repercusión económica.

Aunque en lenguado senegalés, existen trabajos que abordan el estudio de la piel de ejemplares sanos (Arellano y Sarasquete 2006), hasta la fecha, no existen trabajos encaminados a conocer las particularidades de la piel sana en el caso del rodaballo.

| Tipo celular               | Localización | Definición              | Función  | Bacalao ( <i>Gadus morhua</i> ) | Trucha arcoiris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) | Pez cebra ( <i>Danio rerio</i> ) | Equivalencia en piel humana | Referencias  |
|----------------------------|--------------|-------------------------|--|---------------------------------|--|----------------------------------|-----------------------------|--|
| Mucosas:<br>células goblet | Epidermis    | Glándula serosa         | Secreción, protección  | +                               | +  | +                                | Envueltas queratinizadas    | Whitear 1986   |
| Células club               | Epidermis    | Células secretoras      | Sistema de alarma  | -/?                             | -/?  | +                                | -                           | Whitear 1986,<br>Zaccane y col. 1990                   |
| Células epiteliales        | Epidermis    | Epitelio                | Estabilidad, intercambio gaseoso, fuente de proteínas                                  | +                               | +  | +                                | Queratinocitos              | Shiomi y col. 1990, Sire y Akimenko 2004, Meyer y col. |
| Células Merkel             | Epidermis    | Células neuroendocrinas | Función hormonal   | ?                               | ?  | ?                                | Células Merkel              | Moll 1991  |
| Fibroblastos               | Dermis       | Tejido conectivo        | Mantienen la integridad del tejido conectivo, curación de heridas                      | +                               | +  | +                                | Fibroblastos                | Sire y Huysseune 2003, Le Guellec y col. 2004          |
| Melanóforos                | Dermis       | Cromatóforos            | Protección frente a la radiación UV, coloración, cambios de color, defensa frente a la | +                               | +  | +                                | Melanocitos                 | Kaleta 2008, Sköld y col. 2008                         |

|                  |        |  |   |     |     |     |                  |   |
|------------------|--------|--|---|-----|-----|-----|------------------|---|
| Iridóforos       | Dermis | Cromatóforos                                 | Reflexión de la luz   | +   | +   | +   | -                | Kaleta 2008   |
| Xantóforos       | Dermis | Cromatóforos                                 | Coloración  | -/? | -/? | -/? | -                | Kaleta 2008   |
| Vasos sanguíneos | Dermis | Capilares sanguíneos                         | Transporte de sangre  | +   | +   | +   | Vasos sanguíneos | Whitear 1986  |
| Nervios          | Dermis | Nervios aferentes                            | Inervación  | -/? | -/? | -/? | Nervios          | Whitear 1986  |
| Escamas          | Dermis | Placas mineralizadas derivadas del mesodermo | Protección, disminuyen la resistencia del cuerpo al agua, fuente de calcio, propiedades mecánicas | +   | +   | +   | Pelo, dientes    | Long y col. 1996, Gembella y Bartsch 2002, Le Guellec y col. 2004 |

**Tabla 5.** Modificada de Rakers y col. 2010. Tipos celulares en la piel de los peces teleosteos detectados mediante métodos histológicos.

## **1.5. LA TENACIBACULOSIS**

### **1.5.1. Introducción histórica**

La tenacibaculosis o flexibacteriosis marina es una enfermedad ulcerativa que afecta a una gran variedad de peces a nivel mundial (Santos 2005, Toranzo y col. 2005, Austin y Austin 2007). La primera descripción de la tenacibaculosis marina (también conocida con el nombre de flexibacteriosis marina) tuvo lugar en Japón donde afectó a alevines de pargo japonés (*Pagrus major*) y besugo japonés (*Acanthopagrus schlegeli*) y fue descrita por Hikida y col. en 1979. Los primeros casos diagnosticados en Europa se produjeron a finales de los años 70 en cultivos de lenguado común en Escocia y la enfermedad se denominó “Black Patch Necrosis” (BPN, Mc Vicar y White 1979). En el año 1982 Campbell y Buswell relacionaron la enfermedad con la presencia de bacterias filamentosas en tejidos de lenguados afectados por BPN, aislaron la bacteria y resaltaron su similitud con *Flavobacterium columnare* (antes *Flexibacter columnaris*). Sin embargo, la identificación del microorganismo responsable de estos brotes no se pudo realizar hasta el año 1990, fecha en la que se caracterizó y designó con el término específico de *Flexibacter maritimus* (Bernardet y col. 1990). A partir de ese momento, la enfermedad fue conocida bajo diferentes denominaciones que hacían referencia a los síntomas clínicos o a las características de las bacterias (Black Patch Necrosis, enfermedad por bacterias deslizantes de los peces marinos, tenacibaculosis marina, aletas roídas y cola rota, síndrome de la boca erosionada, enfermedad

similar a la causada por *F. columnare*) (McVicar y White 1979, 1982, Wakabayashi y col. 1984, Bernardet y col. 1990, Alsina y Blanch 1993, Handler y col. 1997, Ostland y col. 1999, Cepeda y Santos 2002), provocando cierta confusión en cuanto a la etiología ya que se pensaba que se trataba de enfermedades diferentes. En 1992 Hansen y col. describieron una nueva especie dentro del género *Flexibacter* que afectaba a huevos y larvas de halibut atlántico (*Hippoglossus hippoglossus* L.) por lo que los investigadores propusieron el nombre de *Flexibacter ovolyticus* (sinónimo de *Tenacibaculum ovolyticum*) para esta nueva especie (Suzuki y col. 2001). En la actualidad, *T. maritimum* está considerado como el principal agente causal de tenacibaculosis, en cuanto a mortalidad, en la mayor parte de especies de cultivo y de peces salvajes (Hansen y col. 1992, Bernardet 1997, Bergh y col. 2001, Samuelsen y col. 2006). Sin embargo, otras bacterias filamentosas pertenecientes al género *Tenacibaculum* (*T. gallaicum*, *T. soleae* y *T. discolor*), se han aislado como agentes causantes de mortalidad en diferentes especies de peces marinos (Piñeiro-Vidal y col. 2008a, Piñeiro-Vidal y col. 2008b, López y col. 2010) o han sido aisladas de lesiones externas en la piel (*Tenacibaculum dicentrarchi*) de lubina europea (*Dicentrarchus labrax*), que mostraba signos de tenacibaculosis (Piñeiro-Vidal y col. 2012).

Las descripciones de la tenacibaculosis, desde el punto de vista patológico, son escasas y cuando el proceso está avanzado, las lesiones ulcerativas sobre la superficie externa de la piel son el signo clínico más característico. El tamaño y localización de las

lesiones difieren en función de la especie (Chen y col. 1995, Handler y col. 1997) y también de la edad de los peces (Baxa y col. 1988). Las partes del cuerpo que se ven más frecuentemente afectadas son las aletas, la cola, el opérculo o la cabeza. En algunas especies se han descrito alteraciones en las branquias de los peces como en salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Chen y col. 1995), salmón atlántico (*Salmo salar*) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Handler y col. 1997, Mitchell y Rodger 2011).

Las lesiones ulcerativas favorecen la instauración de infecciones secundarias que agravan el cuadro y que además dificultan el diagnóstico de la enfermedad (Campbell y Buswell 1982, Chen y col. 1995, Handler y col. 1997, Bodammer 2000, Law 2001, Mastan y Qureshi 2001, 2003, Udomkusonsri y col. 2004). La tenacibaculosis se considera además una enfermedad sistémica puesto que se ha aislado el patógeno en órganos internos como el riñón, bazo o hígado (Baxa y col. 1988, Alsina y Blanch 1993, Ostland y col. 1999, Santos y col. 1999, Cepeda y Santos 2002, Avendaño-Herrera y col. 2006a, Olsen y col. 2011) pero a pesar de eso, y hasta el momento, no se han descrito lesiones en dichos órganos.

Los peces que se ven afectados por esta enfermedad empiezan mostrando natación errática, inapetencia, adelgazamiento y dificultad respiratoria (Devesa y col. 1989). Sin embargo, el mecanismo de virulencia del patógeno no se conoce suficientemente en la actualidad. Se ha sugerido que

interacciones sinérgicas entre toxinas bacterianas y enzimas presentes en los productos extracelulares (ECP's) pueden facilitar las lesiones erosivas y necróticas características de la enfermedad. Por un lado, los ECP's de esta bacteria tienen una alta actividad proteolítica, hemolítica y citotóxica en cultivos celulares de pez (Baxa y col. 1988, Pazos 1997, Avendaño-Herrera y col. 2006a). Por otro lado, se ha demostrado de forma experimental en el salmón atlántico, que los ECP's de *T. maritimum* inoculados por vía intraperitoneal provocan necrosis del epitelio branquial y de otros órganos internos (van Gelderen y col. 2009).

### **1.5.2. Taxonomía de la Familia Flavobacteriaceae**

La taxonomía del grupo de bacterias filamentosas no se ha esclarecido hasta el momento. Se han producido a lo largo del tiempo continuos cambios taxonómicos en función del conocimiento de nuevas características fenotípicas y moleculares de los microorganismos, creándose, en ocasiones, nuevos géneros y especies. Muestra de ello, son los diferentes nombres específicos utilizados para designar a los agentes causales de la tenacibaculosis marina. Así, la similitud en las características fisiológicas, bioquímicas y genéticas de los aislados bacterianos obtenidos en Japón en 1977 con el género *Flexibacter*, permitió proponer el nombre de *Flexibacter marinus*, como una nueva especie del género (Hikida y col. 1979). Sin embargo, la coincidencia del epíteto “*marinus*”, con el de *Vibrio marinus*, especie ya vigente en ese momento, lleva a los autores a proponer

el nombre de *Flexibacter maritimus* que no sería aceptado hasta 1986 (Wakabayashi y col.) quedando como cepa tipo la NCIMB 2154. Reinchenbach (1989) intentó una nueva combinación para *Flexibacter marinus*, y propuso el nombre de *Cytophaga marina* como una nueva especie, incluyendo la cepa NCIMB 2153 como cepa tipo. Estudios de hibridación DNA-DNA demostraron posteriormente que ambas cepas correspondían a la misma especie (Bernardet y Grimont 1989) y el nombre específico de *Flexibacter maritimus* prevaleció frente a anteriores propuestas (Holmes 1992).

Estudios basados en el análisis de las secuencias nucleotídicas del gen de la DNA girasa (*gyrB*), han desplazado al microorganismo junto con la especie *Flexibacter ovolyticus*, a un nuevo género “*Tenacibaculum*”, y se han establecido como nuevas especies *Tenacibaculum maritimum*, manteniendo la cepa NCIMB 2154 como cepa tipo de la especie (Suzuki y col. 2001), y *Tenacibaculum ovolyticum* con la cepa NCIMB 13127 como cepa tipo de la especie. Al mismo tiempo, se describen dos nuevos taxones dentro del género *Tenacibaculum*, la especie *T. mesophilum* que tiene como cepa tipo un microorganismo aislado de un homogeneizado de esponjas, y la especie *T. amylolyticum* que tiene como cepa tipo una bacteria aislada de macroalgas en Japón. Posteriormente, Frette y col. (2004) describieron *Tenacibaculum skagerrakense* de origen pelágico y aislada en la Bahía de Skagerrak (Dinamarca). Un año más tarde se introdujo la especie *Tenacibaculum lutimaris* aislada de sedimentos de estuarios en Corea del Sur (Yoon y col. 2005).

Asimismo, *Tenacibaculum litoreum* y *Tenacibaculum aestuarii* se aislaron por primera vez en el año 2006 a partir de sedimentos de estuarios en Corea del Sur (Choi y col. 2006, Jung y col. 2006). Más recientemente, se han descrito las especies *Tenacibaculum litopenaei*, que incluye a microorganismos aislados de tanques de cultivo de gamba en Taiwán (Sheu y col. 2007), *T. discolor* y *T. gallaicum* que incluyen a microorganismos aislados de sistemas de cultivo de rodaballo (Piñeiro-Vidal y col. 2008b), *T. soleae*, aislada de lenguados con lesiones ulcerativas (Piñeiro-Vidal y col. 2008a) y la especie *T. dicentrarchi*, aislada a partir de lesiones en la piel de lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) (Piñeiro-Vidal y col. 2012).

### **1.5.3. Transmisión y reservorio**

A pesar de la repercusión de *T. maritimum* y otras bacterias filamentosas del género *Tenacibaculum* en la industria acuícola, el modo de transmisión y la vía de infección continúan sin esclarecerse. Se han llevado a cabo diferentes estudios con el objeto de obtener un modelo experimental que permita reproducir la enfermedad de manera similar a como se manifiesta en condiciones naturales. Los primeros intentos se realizaron mediante inmersión en baño (Wakabayashi y col. 1984, Baxa y col. 1987). Los resultados concluyeron que este modelo no era válido a menos que previamente se produjera un daño en la piel o que a la bacteria se inoculara y se recuperara a partir de los peces infectados experimentalmente en, como mínimo, dos ensayos independientes (Handler y col. 1997). Las rutas de inoculación

intramuscular e intraperitoneal también se han testado en besugo, dorada y rodaballo pero no se ha podido reproducir la enfermedad con ninguna de las dos vías (Wakabayashi y col. 1984, Alsina y Blanch 1993, Pepin y Emery 1993, Avendaño-Herrera y col. 2006b).

Por otro lado, los reservorios naturales de *T. maritimum* son hasta la fecha desconocidos. Se ha conseguido aislar el agente de sedimento, agua, medusas (*Phialella quadrata*) y de la superficie de tanques que habían estado en contacto con peces infectados de tenacibaculosis y que además habían estado en la proximidad de jaulas de salmón afectados de tenacibaculosis (Carson et al. 1993, Santos y col. 1999, Ferguson y col. 2010). Recientemente, Delannoy y col. (2011) han detectado *T. maritimum* en otra especie de medusas que no habían tenido contacto previo con peces cultivados, sugiriendo que esta especie puede ser un hospedador de la bacteria, actuando como reservorio. Los estudios de supervivencia (Avendaño-Herrera y col. 2006a) han demostrado que la bacteria es capaz de sobrevivir varios meses en agua de mar estéril pero, en cambio, deja de ser cultivable en tan solo cinco días en agua de mar no estéril. En este trabajo se concluye que el agua de mar no es una posible vía de transmisión de *T. maritimum*. Además, se ha comprobado que en condiciones ambientales naturales y en sistemas de cultivo de peces, la bacteria se mantiene en estado viable no cultivable en el agua, sedimento o adherida al mucus de los peces hasta que las condiciones ambientales sean favorables para su crecimiento. Al hilo de esto, se ha descrito que *T. maritimum* posee una gran

capacidad de adherencia al mucus de diferentes especies de peces como dorada (*Sparus aurata*) y rodaballo así como también resistencia a la acción bactericida del propio mucus (Magariños y col. 1995, Pazos 1997).

#### **1.5.4. Rango de hospedadores y distribución geográfica**

La tenacibaculosis se ha descrito en diferentes y numerosas especies de peces y su distribución abarca regiones geográficas muy diversas en varios continentes. La primera descripción tuvo lugar en Japón como agente causal de elevadas mortalidades en varias especies de peces marinos cultivados (Masumura y Wakabayashi 1977, Baxa y col. 1986). A partir de este momento *T. maritimum* ha sido aislado en Europa, América y Australia en diferentes especies de peces de interés económico comercial como son lenguado (*Solea solea* y *S. senegalensis*) (Campbell y Buswell 1982, Cepeda y Santos 2002) salmón atlántico (*Salmo salar*) (Schmidtke y col. 1991) (Ostland y col. 1999), salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) (Pazos y col. 1993), salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*), rodaballo (*P. maxima*) (Alsina y Blanch 1993, Pazos y col. 1993), lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Bernardet y col. 1994), trompeta rayada (*Latris lineata*), “yellow eye-mullet” (*Aldrichetta forsteri*) y besugo negro (*Acanthopagrus butcheri*) (Soltani y col. 1996, Handler y col. 1997). En peces salvajes también ha sido identificado *T. maritimum* como agente causal de tenacibaculosis en especies como la corvina blanca (*Atractoscion nobilis*), anchoa del Norte

(*Engraulis mordax*) y sardina del Pacífico (*Sardinops saxax*) (Chen y col. 1995).

En Galicia, la tenacibaculosis causada por *T. maritimum* se ha convertido en un problema continuo en la acuicultura marina desde principios de la década de los 90. Está considerado, desde 1992, como el principal agente causal de mortalidades en rodaballo, aunque también se aisló de forma esporádica en otras especies como salmón y dorada (Pazos y col. 1993, Pazos 1997, Santos 2005). De hecho, a partir del año 2000 *T. maritimum* se ha aislado de forma sistemática de lenguados cultivados en Galicia (Cepeda y Santos 2002, Santos 2005). En los últimos años se han detectado nuevas bacterias filamentosas relacionadas a nivel fenotípico con *T. maritimum* en rodaballos, lenguados y lubinas enfermas y también en el agua de mar de los tanques de cultivo. Estos microorganismos, fueron inicialmente denominados como especies de *T. maritimum* atípicos o bacterias relacionadas con *T. maritimum* (Piñeiro-Vidal 2004). Sin embargo, la caracterización a nivel molecular y serológico de estos microorganismos ha permitido la descripción de al menos cuatro nuevas especies potencialmente patógenas para peces dentro del género *Tenacibaculum* (Piñeiro-Vidal y col. 2008a, Piñeiro-Vidal y col. 2008b, Piñeiro-Vidal y col. 2012).

#### **1.5.5. Métodos de diagnóstico**

Los métodos de diagnóstico de la tenacibaculosis se basan, en primera instancia, en la observación de los signos clínicos y las

lesiones macroscópicas, junto con la detección de bacterias filamentosas en preparaciones en fresco o teñidas, obtenidas a partir de las lesiones. Este primer acercamiento, si bien es orientativo, presenta limitaciones por lo que el diagnóstico confirmativo de la enfermedad se lleva a cabo mediante el aislamiento de la bacteria y la realización de técnicas microbiológicas clásicas de identificación, el uso de métodos moleculares (PCR simple y anidada, análisis de ácidos grasos) o serológicos (aglutinación en portaobjetos, ensayo Dot Blot, inmunoensayo enzimático) (Toyama y col. 1996, Pazos 1997, Bader y Shotts 1998, Santos y col. 1999, Bernardet y col. 2002, Jensen y col. 2002, Cepeda y col. 2003, Avendaño-Herrera y col. 2004, González y Santos 2009).

*T. maritimum* está considerado como un patógeno oportunista (Avendaño-Herrera y col. 2006a) que además es capaz de resistir la acción bactericida del moco cutáneo (Magariños y col. 1995, Pazos 1997). Por esta razón, cabría la posibilidad de que el patógeno fuera aislado a partir del moco pero que no estuviera provocando un daño en el pez.

Hasta el momento, los métodos de diagnóstico basados en el estudio y caracterización de las lesiones de la tenacibaculosis desde un punto de vista histopatológico son escasos (Handler y col. 1997, Powell y col. 2004, van Gelderen y col. 2009, 2011). Con respecto a la técnica inmunohistoquímica, debemos tener en cuenta que no existen en el mercado anticuerpos específicos para la detección de *T. maritimum* en tejidos y órganos fijados e

incluidos en parafina. Recientemente, van Gelderen y col. (2011) han evaluado la técnica de inmunohistoquímica en el estudio de peces salmónidos infectados experimentalmente con *T. maritimum*. Sin embargo, este estudio se realizó únicamente en restos necróticos de las úlceras. Además, no se valoró la utilidad de esta técnica para el diagnóstico de la tenacibaculosis causada por *T. maritimum* en peces infectados naturalmente, ni se determinó la posible existencia de reactividad cruzada con otras especies de bacterias filamentosas patógenas para peces incluidas dentro del género *Tenacibaculum*.

#### **1.5.6. Respuesta del hospedador**

En cualquier especie resulta clave conocer y caracterizar su fisiología en condiciones normales como paso previo para comparar las modificaciones debidas a la invasión de agentes patógenos.

Los peces teleósteos representan el grupo de peces más avanzado desde un punto de vista evolutivo. Están dotados de un sistema inmunitario bien desarrollado, cuya complejidad aumenta proporcionalmente al grado de evolución de la especie. Generalmente, este sistema consta de timo y sistema vascular y linfático independientes, sin linfonodos ni médula ósea. Sin embargo, las funciones de estos dos últimos órganos son cubiertas por el tejido linfohematopoyético presente en el riñón y en el bazo (Dalmo y col. 1997, Olabuenaga 2000). Este hecho

determina, en gran medida, las peculiaridades del sistema inmunitario de los teleósteos, así como su respuesta inmune.

### **1.5.7. Respuesta inmunitaria innata y adquirida**

La respuesta del sistema inmunitario de los peces teleósteos, al igual que en mamíferos, se puede dividir en dos tipos: innata o inespecífica y adquirida o específica (Iwama y Nakanishi 1996, Olabuenaga 2000, Ellis 2001, Jones 2001, Scapigliati y col. 2002, Magnadóttir 2006, Álvarez-Pellitero 2008, Magnadóttir 2010).

- El sistema inmune innato incluye parámetros físicos y factores humorales y celulares. La respuesta innata o inespecífica, constituye la primera línea de defensa contra la entrada del agente infeccioso. La primera barrera frente a la infección está constituida por la piel y la capa mucosa. La capa mucosa se comporta como un gel que protege al epitelio de las agresiones y normalmente esta capa se erosiona como consecuencia de la eliminación de bacterias adherentes (van der Marel y col. 2008). El mucus está compuesto por mucina y componentes humorales biológicamente activos como las lectinas, proteínas del complemento, lisozima, péptidos antibacterianos e inmunoglobulinas o anticuerpos naturales (secretados por células B sin previa exposición al antígeno) que contribuyen a prevenir la invasión de los tejidos del pez por agentes extraños (Ellis 2001, Magnadóttir 2006, Gómez y Balcázar 2008). Una segunda

barrera física la constituye la mucosa del tracto gastrointestinal, un sistema complejo compuesto por el epitelio gastrointestinal, células del sistema inmune y microbiota residente, cuyo óptimo funcionamiento depende de la integridad del epitelio, de la producción de mucus y de la presencia y equilibrio de bacterias comensales. El equilibrio entre estos componentes es esencial para el mantenimiento de la homeostasis intestinal y de la salud (Salinas y col. 2011).

Los componentes celulares del sistema inmune innato incluyen células fagocíticas (granulocitos, neutrófilos, macrófagos/monocitos) y células naturales citotóxicas (Olabuenaga 2000, Clauss 2008, Magnadottir 2010), aunque las células epiteliales y las dendríticas también participan en la defensa innata en peces (Magnadottir 2010).

- La respuesta adquirida o específica, agrupa mecanismos inmunitarios específicos, constituyendo la segunda barrera contra el organismo invasor. Abarca la respuesta inmune humoral, representada por la producción de anticuerpos específicos (el isotipo de inmunoglobulina descrito en la mayor parte de los teleósteos pertenece a la clase IgM) y la respuesta inmunitaria mediada por células, en la que intervienen las interacciones entre linfocitos T y B y las células presentadoras de antígeno. Las células productoras de anticuerpos derivan directamente de los linfocitos B y su producción está afectada de forma muy significativa

por diferentes neurotransmisores (Flory 1990, Magnadottir 2010).

La organización elemental del sistema inmune de los teleósteos es similar a la que presentan los vertebrados superiores, no obstante se ha descrito una mayor relevancia de la respuesta innata en los peces (Jones 2001), probablemente debido al desarrollo más lento de su respuesta específica. A pesar de esto, la interacción entre inmunidad innata y adquirida es fundamental para el establecimiento de una respuesta inmune efectiva.

La funcionalidad del sistema inmunitario de los animales poiquilotermos también difiere de los mamíferos en su elevada susceptibilidad a factores extrínsecos. En este sentido, la temperatura juega un papel fundamental, de modo que cuanto mayor sea ésta (dentro del rango fisiológico de cada especie), más veloz será el desencadenamiento de la respuesta inmune y mayor su magnitud (Lamers y De Haas 1985, Laudan y col. 1986, Ferguson 1989).

Los mecanismos innatos de defensa de los peces teleósteos frente a las bacterias involucran a un amplio espectro de sustancias antimicrobianas y proteínas de fase aguda, activación de la vía alternativa del complemento, liberación de citoquinas, inflamación y fagocitosis (Ellis 2001, Magnadottir 2006, Clauss 2008, Magnadottir 2010).

Actualmente, los mecanismos de defensa que se activan específicamente frente a *T. maritimum* no se conocen con exactitud. Los estudios realizados hasta el momento indican que *T. maritimum* es resistente a la acción bactericida del mucus (Magariños y col. 1995, Pazos 1997). Por otro lado, se ha demostrado que la infección experimental del rodaballo con *T. maritimum* produce un incremento de la actividad lisozima y bactericida del suero (Domínguez-Merelles 2009). Asimismo se ha confirmado que la incubación de leucocitos de riñón anterior de rodaballo con células de *T. maritimum*, produce un incremento de la actividad respiratoria de los fagocitos (El Morabit y col. 2006, García-Lamas y col. 2010).

En cuanto a la respuesta inmunitaria adquirida, todos los mecanismos básicos están presentes también en los peces, sin embargo, en comparación con los mamíferos, el repertorio de anticuerpos en peces está más restringido. De hecho, muchos experimentos han demostrado que los peces son capaces de mostrar mayor resistencia a un determinado patógeno en una segunda exposición al mismo al igual que ocurre en los mamíferos. El elemento clave en estas respuestas son las células de memoria y los anticuerpos específicos (Magnadottir 2010). Además, en los mamíferos la respuesta específica de los anticuerpos frente a un patógeno es un buen indicador de la eficacia de una vacuna y, por lo tanto, de la capacidad de respuesta del sistema inmune adquirido. Sin embargo, existen pocos estudios que aborden estos aspectos en los peces (Erdal y Reitan 1992, Samuelsen y col. 2006, Corripio-Miyar y col. 2007,

Pakingking Jr y col. 2010) o los que hay muestran resultados muy variables (Schrøder y col. 2009).

**CAPÍTULO 2.**  
**OBJETIVOS**



Este trabajo de Tesis Doctoral se enmarca dentro de una línea de investigación desarrollada conjuntamente por el grupo de *Anatomía Patológica Veterinaria* (GI-1707) y el grupo de *Diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades infecciosas* (GI-1218) de la Universidad de Santiago de Compostela, en colaboración con el Clúster de la Acuicultura de Galicia y la empresa Stolt Sea Farm S.A., y en el contexto de varios proyectos de investigación financiados con fondos autonómicos. El objetivo general de la presente Tesis Doctoral es abordar en mayor profundidad la morfopatología y etiopatogenia de una enfermedad ulcerativa de la piel del lenguado y del rodaballo, causada por *Tenacibaculum maritimum*. En este sentido, los objetivos concretos son:

1. Caracterización histológica y ultraestructural de la piel, utilizando de modelo el rodaballo, con el propósito de establecer las bases para los estudios morfopatológicos y de respuesta inmunitaria.
2. Esclarecimiento de la etiopatogenia de una nueva enfermedad ulcerativa de la piel del lenguado y su posible relación con la tenacibaculosis.
3. Desarrollo de una técnica inmunohistoquímica para la detección de *T. maritimum* en secciones en parafina, para su aplicación al estudio de la patogenia y al diagnóstico de la tenacibaculosis.
4. Caracterización morfopatológica y patogénica de la tenacibaculosis en lenguado y rodaballo.

5. Caracterización de la respuesta inflamatoria e inmunitaria específica frente a *T. maritimum* mediante el empleo de técnicas hematológicas, histológicas e inmunohistoquímicas.

**CAPÍTULO 3.**  
**MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES**



### **3.1. PROCEDENCIA DE LOS PECES**

Para estudiar las características de las células y estructuras de la piel normal (Capítulo 4) se utilizaron rodaballos sanos (peso medio de  $449,2 \pm 2,86$  g) procedentes de la empresa Stolt Sea Farm S.A.

Con el propósito de realizar la caracterización morfológica y etiopatogénica de la enfermedad ulcerativa del lenguado, se tomaron muestras de ejemplares procedentes de un lote de engorde de una granja de Galicia en el que se produjo un brote de dicha enfermedad ulcerativa (Capítulo 5).

Además, para comprobar la efectividad diagnóstica de la técnica inmunohistoquímica (IHQ) se emplearon muestras histológicas de lenguados procedentes de diferentes brotes de enfermedad ulcerativa ocurridos entre los años 2003 a 2005. En estos lenguados se habían observado macroscópica e histológicamente lesiones erosivas y ulcerativas cutáneas y en todos los ejemplares se había aislado e identificado *Tenacibaculum maritimum* como agente causal de la infección (Capítulo 6).

Para la realización de las infecciones experimentales con *T. maritimum* se emplearon lenguados y rodaballos sanos (peso medio  $11,47 \pm 2,16$  g y  $62,11 \pm 27,32$  g, respectivamente) (Capítulos 6, 7 y 8). Tanto los lenguados como los rodaballos empleados en las inoculaciones experimentales fueron

suministrados por la empresa Stolt Sea Farm S.A. y por el Clúster de la Acuicultura de Galicia.

### **3.2. INSTALACIONES**

Las infecciones experimentales se realizaron en las instalaciones del acuario de la Facultad de Biología de la Universidad de Santiago de Compostela y en el Clúster de la Acuicultura de Galicia.

El trabajo experimental de la presente Tesis Doctoral se llevó a cabo, en gran parte, en el laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela. En dicho laboratorio se realizaron los estudios hematológicos, histológicos, inmunohistoquímicos y de microscopía electrónica.

Los ensayos de infección experimental, el aislamiento y caracterización taxonómica de las bacterias aisladas a partir de peces enfermos y/o su identificación mediante métodos serológicos y moleculares, y la obtención y purificación de los sueros anti-*T. maritimum* (utilizados en las técnicas IHQ) se realizaron en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Biología-Edificio CIBUS.

### 3.3. INFECCIÓN EXPERIMENTAL

Durante la realización del presente trabajo fueron necesarias tres inoculaciones experimentales empleando la bacteria *T. maritimum*. La primera experiencia se realizó en lenguados mediante inoculación por vía subcutánea en el seno dorsal medio (Figura 1). Estos ejemplares se utilizaron como controles positivos de *T. maritimum* para la puesta a punto de las técnicas de IHQ (Capítulo 6). La segunda experiencia se realizó también por vía subcutánea a través del seno dorsal medio en rodaballos (Capítulos 7 y 8).

En ambos casos, en el grupo de peces retados se inoculó una cantidad de 0,1 ml. La concentración del inóculo empleada fue de  $10^8$  ufc/pez de la cepa LL01.8.3.8 de *T. maritimum*.



---

**Figura 1.** Inoculación experimental subcutánea de un lenguado en el seno dorsal medio.

---

En el tercer experimento la inoculación se realizó por vía intraperitoneal en rodaballos (Capítulo 7). En el grupo de peces retados se utilizaron dos concentraciones del inóculo. En la dosis alta se inoculó una cantidad de 0,1 ml a una concentración de  $10^9$  ufc/pez, mientras que en la dosis baja se inoculó una cantidad

de 0,1 ml a una concentración de  $10^8$  ufc/pez de la cepa LL01.8.3.8 de *T. maritimum*.

En todas las experiencias se mantuvieron grupos control hasta su finalización. Estos peces se inyectaron utilizando 0,1 ml de solución salina estéril por la misma vía de inoculación que los peces retados de cada experimento. La segunda y la tercera experiencia se emplearon para abordar el estudio de la patogenicidad de la tenacibaculosis y la respuesta inmune del rodaballo frente a la bacteria.

En los tres experimentos tanto los peces de los grupos control como de los retados se sacrificaron a diferentes tiempos post-inoculación mediante sobredosis del anestésico MS222 (Sigma-Aldrich, Germany).

### **3.4. TOMA DE MUESTRAS DE LOS EJEMPLARES**

Para el estudio histológico de la piel normal del rodaballo se tomaron fragmentos de piel dorsal y ventral de peces que mostraban diferente coloración (Capítulo 4). Las muestras obtenidas se fijaron en formol, líquido de Bouin o glutaraldehído. Finalmente, se tomaron muestras de piel que se cubrieron de un crioprotector (Tissue Tek®, Netherlands) y posteriormente se fijaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Para el estudio de la enfermedad ulcerativa del lenguado (Capítulo 5) se seleccionaron ejemplares, procedentes de un lote de engorde, que mostraban lesiones ulcerativas cutáneas severas, morbilidad del 20% y mortalidad del 0,1% por mes. Tras el sacrificio se les realizó la necropsia y se tomaron muestras de diferentes secciones transversales de la piel abarcando hipodermis y músculo, y también de órganos internos (bazo, riñón, intestino, hígado y branquias).

En los experimentos de inoculación de *T. maritimum* (Capítulos 6, 7 y 8) se siguió el siguiente protocolo para la toma de muestras. Se registró el peso y longitud de cada uno de los ejemplares muestreados y se les extrajo sangre mediante venopunción de la vena caudal en un punto próximo a la línea media y anterior al pedúnculo caudal (Figura 2).

Una parte de la sangre obtenida se utilizó de inmediato para la medición del hematocrito en capilares sanguíneos heparinizados y se realizaron extensiones sanguíneas para el recuento de leucocitos (Capítulo 8).



---

**Figura 2.** Extracción de sangre en la vena caudal.

---

El resto de la sangre se recogió en tubos tratados con heparina cuyos sueros no se emplearon en este trabajo. Tras el sacrificio de los peces se realizó la necropsia y se tomaron secciones seriadas

transversales de la piel de todo el pez que también incluían hipodermis y musculatura. También se recogieron muestras de bazo, riñón, branquias, hígado, timo, corazón, encéfalo y tracto gastrointestinal (esófago, estómago, ciegos pilóricos, intestino anterior, medio y posterior) (Figura 3).

Las muestras tomadas en los diferentes experimentos se fijaron en líquido de Bouin y formol para los estudios histopatológicos y de IHQ (Capítulos 5, 6, 7 y 8).

Para los estudios de microscopía electrónica (Capítulos 4 y 5) la fijación de las muestras se realizó en glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato 0,1 M a pH 7,3 durante 4 h a una temperatura de 4°C.

### **3.5. ESTUDIO MICROBIOLÓGICO**

Para el aislamiento y posterior caracterización microbiológica se tomaron muestras de piel y órganos internos en condiciones asépticas y se sembraron en medios de cultivo generales, selectivos y diferenciales. La caracterización taxonómica de las bacterias aisladas se realizó utilizando métodos microbiológicos convencionales en tubo y placa y los sistemas multiprueba API (bioMérieux) (Capítulos 5, 6 y 7).

Para la detección de *T. maritimum* en los tejidos de peces mediante PCR, se utilizó la metodología descrita por Cepeda y col. (2003) (Capítulos 5, 6 y 7).



---

**Figura 3.** Técnica de necropsia en lenguado. **A.** Incisiones sobre la piel de la región celómica. **B.** Retirada de la pared abdominal para acceder a los órganos internos. **C.** Retirada de los órganos de la cavidad. **D.** Paquete visceral abdominal completamente retirado.

---

### **3.6. PROCESADO DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ÓPTICA Y ELECTRÓNICA**

Después de la fijación, las muestras se incluyeron en parafina y se realizaron cortes de 2-3  $\mu\text{m}$  de espesor, que se recogieron en portaobjetos previamente tratados con silane. Por último se secaron durante aproximadamente 12 h en estufa a 37°C (todos los Capítulos).

Las muestras de piel congeladas (Capítulo 4) se cortaron con un criostato a una temperatura de  $-25^{\circ}\text{C}$  y a unos  $30\ \mu\text{m}$  de espesor y se recogieron en portaobjetos tratados previamente con silane. Finalmente los cortes obtenidos se observaron directamente en un microscopio óptico sin someterlas a ninguna técnica de tinción.

Las muestras que se procesaron para microscopía electrónica se sometieron a postfijación en solución de tetraóxido de osmio al 1% en tampón cacodilato 0,1 M durante 45 min a  $35^{\circ}\text{C}$  y se deshidrataron. Después de la deshidratación, las muestras de microscopía electrónica de barrido (Capítulos 4 y 5) se sometieron a la técnica de secado a punto crítico y se metalizaron con oro. La observación de las muestras se llevó a cabo mediante un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6360LV. Para microscopía electrónica de transmisión (Capítulo 4), después de la deshidratación, las muestras se incluyeron en Epon, se realizaron cortes ultrafinos (80 nm) que fueron teñidos con acetato de uranilo y finalmente observados mediante un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1011.

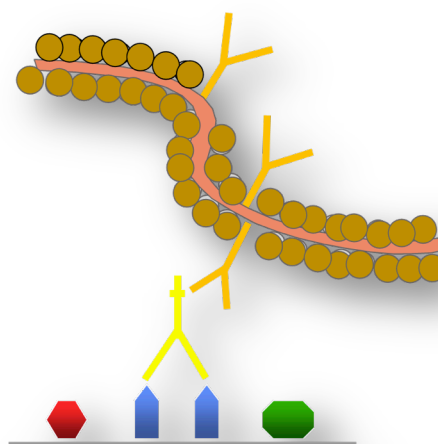
### **3.7. TÉCNICAS DE TINCIÓN**

Las técnicas de tinción empleadas fueron hematoxilina-eosina, azul de toluidina, PAS, PAS alcian-blue, tinción de Gram, tricrómico de Gallego y rojo de alizarina. Todas las técnicas de tinción se realizaron siguiendo los protocolos descritos en Bancroft y col. (1994).

### 3.8. TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS

Las tinciones IHQ se emplearon para los estudios realizados en los Capítulos 4, 6, 7 y 8. El protocolo general para la realización de estas técnicas se resume a continuación y las posibles variaciones están recogidas en cada capítulo.

Los cortes se incubaron durante 30 min en reactivo de bloqueo de peroxidasa para inactivar la peroxidasa endógena de los tejidos. Se procedió a la exposición



antigénica, en caso de ser necesaria,

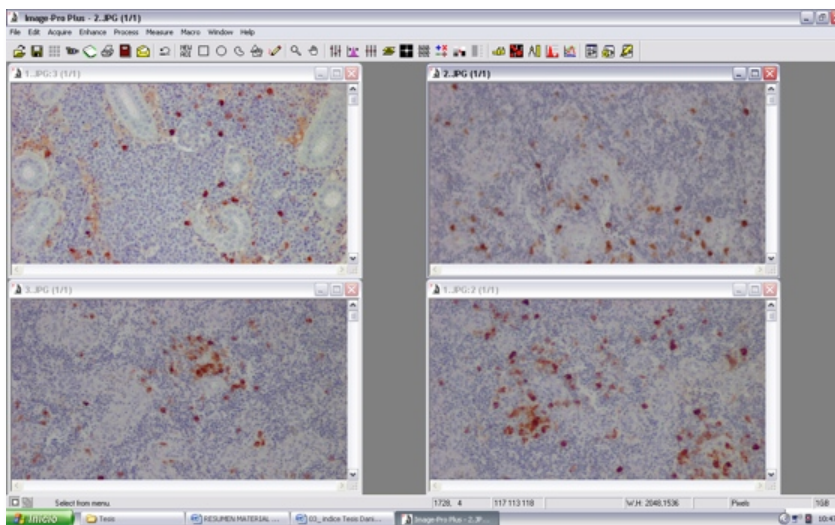
**Figura 4.** Esquema de la técnica inmunohistoquímica empleada para marcar los diferentes antígenos.

según los requerimientos de cada anticuerpo. A continuación se incubaron las secciones con el anticuerpo primario correspondiente durante el tiempo de incubación óptimo en cada caso. Posteriormente se procedió a la incubación durante 30 min con el polímero EnVision+ System Labelled Polymer-HRP anti-conejo o anti-ratón (Dako, Denmak) según el origen del anticuerpo primario (Figura 4). Por último, las muestras se revelaron empleando diaminobenzidina o Vector VIP (Vector Laboratories, UK) y se contrastaron con hematoxilina.

En aquellos casos en los que se consideró preciso estandarizar los tiempos de incubación, revelado y contraste (Capítulos 6, 7 y 8), las inmunotinciones se realizaron utilizando un sistema de procesado de portaobjetos automatizado.

### **3.9. ANÁLISIS DE IMÁGENES**

La determinación del número de células Ig<sup>+</sup> presentes en cada órgano (Capítulo 8) se realizó a partir de imágenes obtenidas por medio de una cámara fotográfica digital (Olympus DP12) acoplada al microscopio. Estas fotografías fueron tratadas mediante el programa de análisis de imagen Image Pro Plus 4.5 con el que se cuantificó el número de células reactivas al anticuerpo anti-IgM (Figura 5).



**Figura 5.** Captura de imagen durante el recuento de células Ig<sup>+</sup> mediante el programa Image Pro Plus.

---

### **3.10. ESTUDIOS HEMATOLÓGICOS**

Los capilares sanguíneos heparinizados fueron centrifugados a 13700 x g durante 2 min y el hematocrito se midió empleando un lector de hematocrito. Los porcentajes de los diferentes tipos de leucocitos en sangre periférica se determinaron empleando las extensiones sanguíneas contando un mínimo de 200 leucocitos en cada extensión. Los diferentes tipos celulares fueron identificados por su morfología, tamaño y características de tinción siguiendo los criterios establecidos por Quentel y Obach (1992).

### **3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico se realizó en el Capítulo 8 para evaluar los resultados obtenidos del estudio hematológico y de recuento de células Ig+. Para determinar las diferencias significativas entre los rodaballos control y retados en cada punto de muestreo se empleó el test de Mann Whitney. Por otro lado, para buscar las diferencias entre los seis puntos de muestreo dentro de cada grupo, se realizó el análisis de la varianza de Kruskal Wallis seguido de un método de Dunn.



**CAPÍTULO 4.**  
**MORPHOLOGICAL,**  
**IMMUNOHISTOCHEMICAL AND**  
**ULTRASTRUCTURAL CHARACTERIZATION**  
**OF THE SKIN OF TURBOT**



#### **4.1. INTRODUCTION**

The skin, the largest organ of the body of the fish, exerts multiple vital protective functions against environmental aggressions and is crucial for communication between individuals (Elliot 2000, Roberts 2001, Rakers et al. 2009). It is considered a sensitive organ, and the maintenance of the characteristics of a healthy integument is important from both pathological and economical points of view. Cutaneous lesions are common in fish and ulcerative diseases are one of the most usual pathologies affecting both cultured and wild fish (Noga and Udomkusonsri 2002). The lesions in the skin of fish cause significant economic losses in aquaculture worldwide because the affected animals cannot be marketed, or its value could decrease (Toranzo et al. 2005, Vilar et al. 2012). Moreover, the epidermal damage provides an access way for the infectious agents and it also produces an osmotic stress that can be life threatening for the fish. Therefore, the knowledge of the structure and morphometry of the healthy skin of fishes is necessary in order to correctly interpret pathological changes (Ferguson 2006). In addition, fish skin models are being used in dermatology research and as models of a wide variety of human diseases (Rakers et al. 2009).

Coloration in fish takes part in different biological functions like concealment or camouflage, and intraspecific or interspecific communication (Groff 2001). In addition, pigmentation is an important issue from a commercial point of view since malpigmentation is common in hatchery-reared flatfishes,

decreasing the market value of whole fish (Bolker and Hill 2000). Moreover, achieving a uniform coloration is crucial for fish farms to reach a homogeneous stock of fish suitable for the different market areas, although this goal is difficult because pigmentation is influenced by environment and diet (Fujii 1993, Bolker and Hill 2000). For these reasons, aquaculture farms are making a great effort to understand the factors that influence the pigmentation and thus improve the quality of the final product. Besides, in the last years the pigmentation of the fish skin has gained a growing attention by the pathologists and producers because cutaneous discoloration has been described associated with some infectious diseases in fish (van Gelderen et al. 2009, Magi et al. 2009, Vilar et al. 2012) and they are considered early lesions (Corrales et al. 2009, Vilar et al. 2012).

Pigmentation in fish is the result of the interaction between different pigimentary cells named chromatophores located in the pigimentary layers of the animals (Bagnara et al. 1968, Bagnara and Hadley 1973, Prum and Torres 2003). There are several types of chromatophores involved in the coloration of lower animals, including melanophores (black or brown), xanthophores (orange or yellow), erythrophores (red), leucophores (whitish) and iridophores (metallic or iridescent) (Fujii 1993, Fujii 2000). Recently, a new class of chromatophore named erythro-iridophore has been described (Goda et al. 2011).

Despite the great importance of cutaneous diseases and malpigmentation in turbot, no studies have been addressed on the

histology of normal skin in turbot. Therefore, the aim of the current study was to obtain a better characterization and knowledge of the healthy turbot skin, using histological, immunohistochemical and ultrastructural techniques. In addition, description and localization of the chromatophores and cells from the immune system in skin were provided.

## **4.2. MATERIALS AND METHODS**





### **4.2.1. Fish**

Sixteen healthy turbot (weight  $449,2 \pm 2,86$  g) obtained from a fish farm in Northwest Spain were employed for histological and ultrastructural studies. Animals used for histological studies were divided in three groups according with the pigmentary pattern they showed: brown-yellowish, brown-grayish and dark, and one turbot with grey pigmentation was used to ultrastructural studies (Table 1).

### **4.2.2. Light microscopy**

Skin pieces of  $1\text{ cm}^3$  were taken from several locations of the dorsal and ventral surface of turbot skin. Samples were fixed in 10 % neutral buffered formalin, dehydrated in alcohol, cleared in xylene and embedded in paraffin. Thin sections ( $2\text{-}3\ \mu\text{m}$ ) were stained with hematoxylin-eosin (H-E), alizarin red, Gallego's trichrome, PAS-Alcian blue and toluidine blue.

Other samples were embedded in cryoprotectant (Tissue Tek®, Netherlands), frozen in liquid nitrogen, cut 30 µm thickness by means of a cryostat at -25 °C, placed in silane coated slides and observed in fresh to prevent the loss of carotenoid pigments during processing of samples.

| Type of samples              | Number of fish | Picture  |
|------------------------------|----------------|--|
| <b>Light microscopy</b>      | 5 turbot       | <br><b>brown-yellowish</b> |
|                              | 5 turbot       | <br><b>brown-grayish</b>   |
|                              | 5 turbot       | <br><b>dark</b>          |
| <b>Ultrastructural study</b> | 1 turbot       | <br><b>grey</b>           |

**Table 1.** Groups of fish used in the study according to pigmentation.

#### **4.2.3. Transmission and scanning electron microscopy (TEM and SEM)**

For TEM, small pieces from several points of skin were sampled, fixed in 2.5 % glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.3)

for 4 h at 4 °C. Afterward, they were post-fixed in 1 % osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffer, dehydrated and embedded in epoxy resin. Ultrathin sections (80 nm) were stained with uranyl acetate and then observed with a JEOL JEM-1011 transmission electron microscope. For SEM, after dehydrated, critical point drying was done and finally coating with gold. Samples were observed with a JEOL JSM-6360LV scanning electron microscope.

#### **4.2.4. Immunohistochemistry**

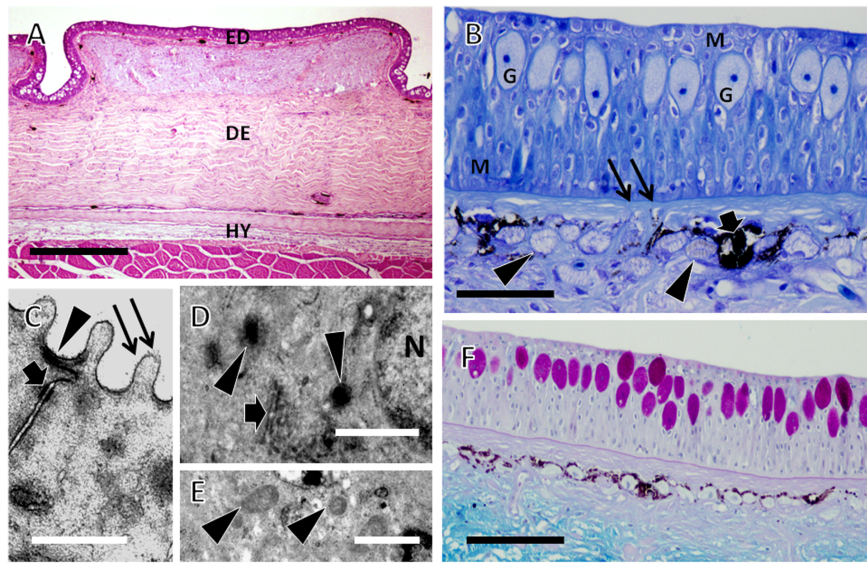
For the immunohistochemistry assay, all incubations were performed at room temperature in a humid chamber and all washing procedures consisted of three successive 5 min immersions in phosphate-buffered saline (PBS; 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 0.5% (v/v) Tween 20, pH 7.4). Endogenous peroxidase activity was quenched after incubation for 30 min with Peroxidase Blocking Reagent (Dako, Denmark). Then, sections were washed and incubated with the antibodies indicated in Table 2, washed and incubated for 30 min with an anti-rabbit EnVision+ System Labelled Polymer-HRP (Dako). After rinsing, the sections were finally developed using as chromogen diaminobenzidine (Dako) or Vector VIP (Vector Laboratories, UK), washed in water, counterstained with hematoxylin, dehydrated and mounted. Negative controls were carried out substituting the primary or the secondary antibody for PBS or an irrelevant polyclonal antibody. Adequate sections of mammalian tissues were used as positive controls.

| Primary antibody       | Clon / Reference                  | Result | Dilution     | Time | Antigen retrieval  |
|------------------------|-----------------------------------|--------|--------------|------|--------------------|
| <b>CD3</b>             | Polyclonal / Dako IR503/IS503     | +      | Ready to use | 2 h  | 15' Tris EDTA pH 9 |
| <b>Cytokeratin WSS</b> | Polyclonal / Dako N1512           | +      | 1/500        | 2 h  | 10' Citrate pH 6   |
| <b>Enolase</b>         | Polyclonal / Biomeda 215M         | -      | 1/15         | 2 h  | 10' Citrate pH 6   |
| <b>GFAP</b>            | Polyclonal / Biomeda V2023        | -      | 1/50         | 2 h  | 15' Citrate pH 6   |
| <b>IgM</b>             | Polyclonal / Dr. Karl Pedersen    | +      | 1/10000      | 2 h  | 15' Citrate pH 6   |
| <b>Lysozyme</b>        | Polyclonal / Dra. Ariadna Sitjà   | +      | 1/400        | 2 h  | 5' Proteinase K    |
| <b>N-Cadherin</b>      | GC 4 / Sigma-Aldrich C3865        | -      | 1/50         | 1 h  | 20' Citrate pH 6   |
| <b>S100</b>            | Polyclonal / Neomarkers RB-044-A0 | +      | 1/400        | 2 h  | 15' Citrate pH 6   |
| <b>Vimentin</b>        | V9 / Dako M0725                   | -      | 1/200        | 2 h  | 15' Citrate pH 6   |

**Table 2.** Data of antibodies used in the study.

### 4.3. RESULTS

On light microscopy, the skin of turbot from both the dorsal and ventral side was organised in three layers: epidermis, dermis and hypodermis (Figure 1 A).

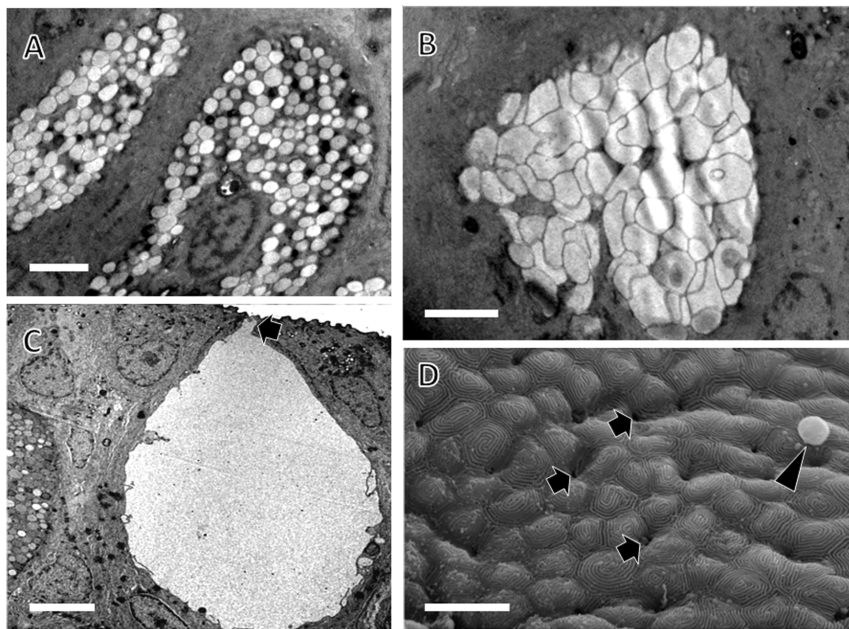


**Figure 1.** Skin of turbot. **A.** Three layers of skin: epidermis (ED), dermis (DE) and hypodermis (HY). H-E. Bar 500  $\mu$ m. **B.** Malpighian cells (M) and goblet cells (G), basal membrane (double arrow). Melanophore (arrow), iridophores (arrowheads). Toluidine blue. Bar 50  $\mu$ m. **C.** Superficial epithelial cells with tight junctions (arrowhead), desmosomes (arrow) and microridges (double arrow). TEM. Bar 1000 nm. **D.** Lysosomes (arrowheads), rough endoplasmic reticulum (arrow) and nuclei (N). TEM. Bar 1000 nm. **E.** Detail of epithelial cell with mitochondria (arrowheads). TEM. Bar 1000 nm. **F.** PAS positive goblet cells in the epidermis. PAS-AB. Bar 100  $\mu$ m.

The epidermis showed a non-keratinizing stratified squamous epithelium that varied in thickness from 5 to 14 cell layers and 60 to 100  $\mu$ m in size. Malpighian cells were the predominant

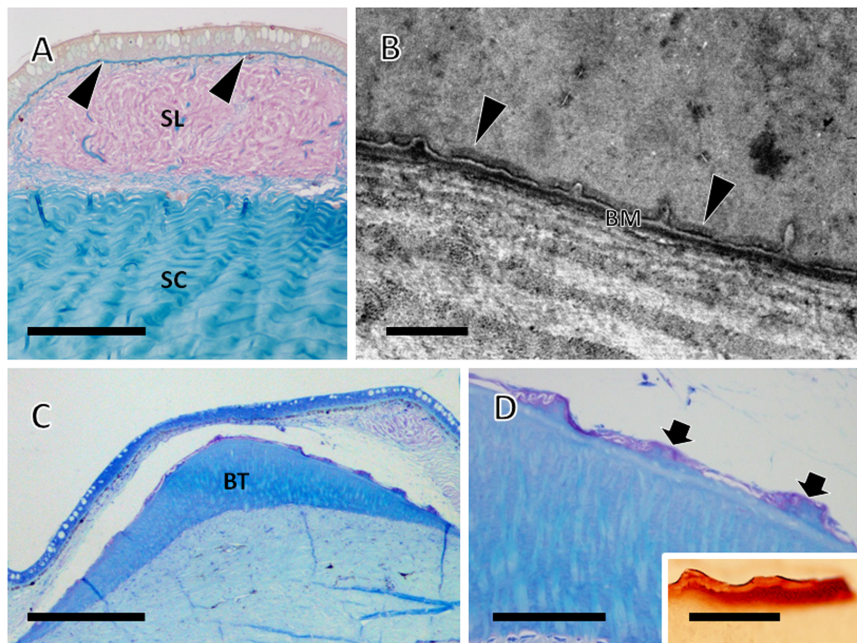
epidermal cell and displayed different morphologies from basal to superficial location; just upon the basal membrane, epithelial cells were cubical, in the middle of epidermis showed columnar shape and in the upper region they had a flattened morphology (Figure 1 B). Ultrastructurally, these cells possessed microridges located in the apical pole (Figure 1 C) and were connected to adjacent cells by tight junctions and desmosomes (Figure 1 C). In the cytoplasm, epithelial cells contained a large number of mitochondria close to the nucleus, rough endoplasmic reticulum (rER), and lysosomes (Figures 1 D and 1 E).

Goblet cells were randomly distributed between malpighian cells in the epidermis. These mucous cells occupied the entire thickness of the epidermis and displayed a spherical to elongated morphology (Figure 1 B). Their pale cytoplasm was dilated due to their granular content and the nucleus was located centrally or in the basal pole of the cell (Figure 1 B). These cells showed a strong PAS positive reaction in their cytoplasm (Figure 1 F) whereas no positive reaction to the Alcian Blue was observed. At TEM level, the cytoplasm of goblet cells displayed granular appearance with a large number of secreting vesicles with different electrodensity (Figure 2 A) which coalesced in the apical pole prior to discharge their content (Figures 2 B and 2 C). Mucous cells were often open to the epidermal surface through an apical pore and were connected by desmosomes to adjacent epithelial cells (Figures 2 C and 2 D). In the luminal surface of epithelial cells, numerous microridges formed a typical fingerprint pattern was observed (Figure 2 D).



**Figure 2.** **A.** Goblet cells with a large number of secreting vesicles with different electrodensity and nuclei centrally located. TEM. Bar 2000 nm. **B.** Goblet cell with secreting vesicles coalescing prior to discharge. TEM. Bar 2000 nm. **C.** Goblet cell opening to the external surface located in the apical pole of the cell (arrow). TEM. Bar 5000 nm. **D.** Surface of the skin with microridges and pores of goblet cells (arrows) and mucus (arrowhead). SEM. Bar 10  $\mu$ m.

Epidermis was separated from dermis by the basement membrane, which showed light blue colour with Gallego's trichrome staining (Figure 3 A). Ultrastructurally, basement membrane displayed two layers, an electron-lucent layer (lamina lucida) and below an electron-dense (lamina densa). Cell membranes of the basal malpighian cells were attached to basement membrane by means of hemidesmosomes (Figure 3 B). Immediately under the basement membrane, dense parallel bundles of collagen were firmly attached (Figure 3 B).



---

**Figure 3.** **A.** Basement membrane (arrowheads), dermis with stratum laxum (SL) and stratum compactum (SC). Gallego's trichrome. Bar 200  $\mu$ m **B.** Basement membrane (BM) with several bundles of collagen and hemidesmosomes (arrowheads). TEM. Bar 2000 nm. **C.** Bony tubercle (BT) displayed typical conical shape. Gallego's trichrome. Bar 500  $\mu$ m. **D.** Detail of external layer of the tubercle with calcium deposits (arrows). Toluidine blue. Bar 20  $\mu$ m. **Inset.** Detail of calcium deposits stained with Alizarin red. Bar 10  $\mu$ m.

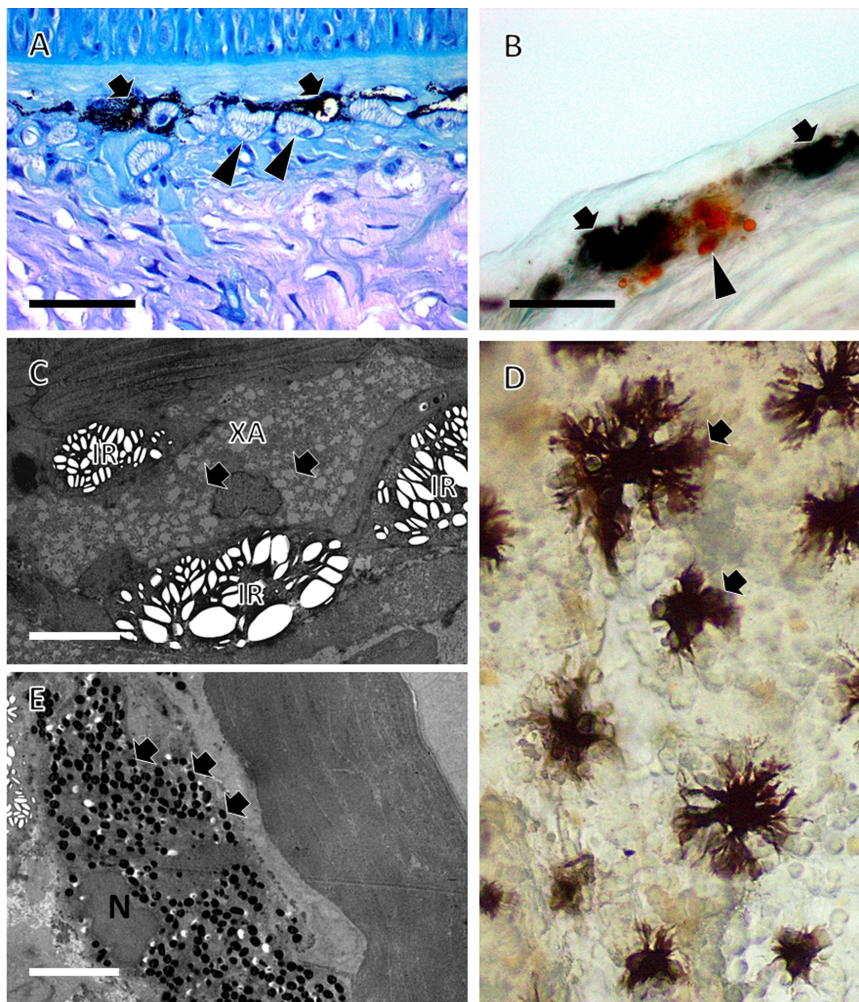
---

The dermis was divided in two well-differentiated layers, the superficial stratum laxum and the deeper stratum compactum (Figure 3 A). Stratum laxum contained different amounts of collagen fibers, reticulin fibers and pigmentary cells forming a loose layer. Stratum compactum was formed by densely packed bundles of collagen fibers organized mostly parallel to the skin surface (Figure 3 A). In some areas, stratum laxum was absent, so that stratum compactum was in direct contact with basement membrane (Figure 1 A).

Turbot skin had neither scales nor scale pockets. On the contrary, skin showed bony tubercles with conical shape located in the dermis. These tubercles were composed by a great amount of collagen fibers and small amounts of calcium on the top (Figures 3 C, 3 D and 3 D inset).

Hypodermis was mainly composed by loose connective tissue with a high number of adipocytes and a variable amount of fibroblasts, collagen and blood vessels (Figure 1 A).

In turbot, two pigmentary layers could be identified: the pigmentary layer of dermis was located between basement membrane and dermis, and the pigmentary layer of hypodermis immediately above the muscular layer. Three different types of chromatophores were present: melanophores, iridophores and xanthophores (Figures 4 A and 4 B). Generally, chromatophores were arranged following the same pattern, with the melanophores and xanthophores interrelated in the most superficial level and the iridophores placed immediately under the former.



---

**Figure 4.** **A.** Pigmentary layer of dermis with melanophores (arrows) and iridophores (arrowheads). Toluidine blue. Bar 50  $\mu\text{m}$  **B.** Pigmentary layer of dermis with melanophores (arrows) and xanthophores (arrowhead). Fresh section. Bar 20  $\mu\text{m}$  **C.** Xanthophore (XA) containing cytoplasmic granules of different electron densities (arrows) and in close contact with iridophores (IR). TEM. Bar 5000 nm. **D.** Melanophores showing typical stellate morphology (arrows). Fresh section. Stereoscopic microscope. **E.** Melanophore with several melanosomes (arrows) full of melanin in the cytoplasm and nuclei (N) peripherally located. TEM. Bar 5000 nm.

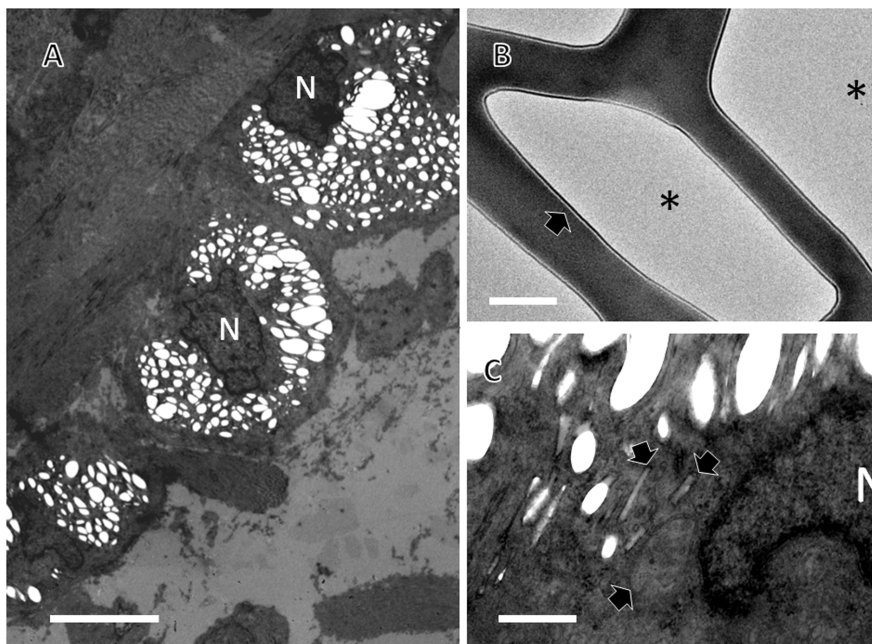
---

In unstained fresh sections, xanthophores displayed an orange to yellow colour due to the pigments contained in their cytoplasm. They were randomly distributed between melanophores and in close contact with iridophores throughout the pigmentary layer of dermis (Figure 4 B and 4 C). By means of TEM, these cells showed a stellate shape and cytoplasmic granules of several sizes with different electrodensity as well as an irregular nucleus peripherally located (Figure 4 C).

Melanophores, pigment cells more abundant in the skin of the turbot, showed a star-shaped form and dark-brown or black colour on light microscopy (Figure 4 D) with dendritic processes that established an intimate contact with the iridophores (Figure 4 A).

By means of TEM, large numbers of melanosomes containing melanin and showing different electrodensity could be observed within the cytoplasm of melanophores (Figure 4 E). The indented nucleus was rounded to oval, with dense chromatin.

Iridophores possessed a rounded to elliptical morphology and the cytoplasm showed a striated appearance in samples stained with toluidine blue (Figure 4 A). Ultrastructurally, cytoplasm contained several crystalline platelets slightly electrodense surrounded by a single membrane (Figures 5 A and 5 B). Near the nucleus, endoplasmic reticulum with different sizes and flattened to rounded morphology could be seen (Figure 5 C). The nucleus was irregular in shape and located central or peripherally (Figure 5 A).



---

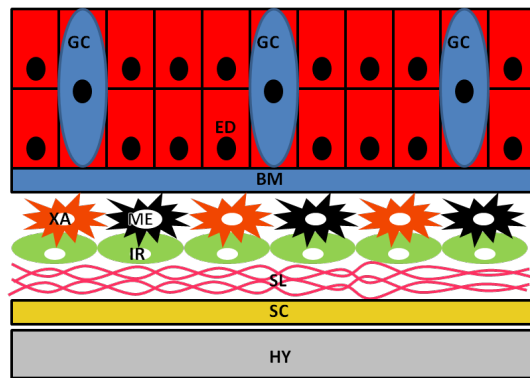
**Figure 5.** **A.** Iridophores in the pigmentary layer with cytoplasm showing empty spaces and nucleus (N) located centrally or peripherally. TEM. Bar 5000 nm. **B.** Crystalline platelets (asterisk) in the cytoplasm of iridophores surrounded by a single membrane (arrow). TEM. Bar 200 nm. **C.** Endoplasmic reticulum cisterns with different morphologies (arrows) near to the nuclei. TEM. Bar 500 nm.

---

In Figure 6 the structure of skin of turbot and the relationships between the different components are outlined.

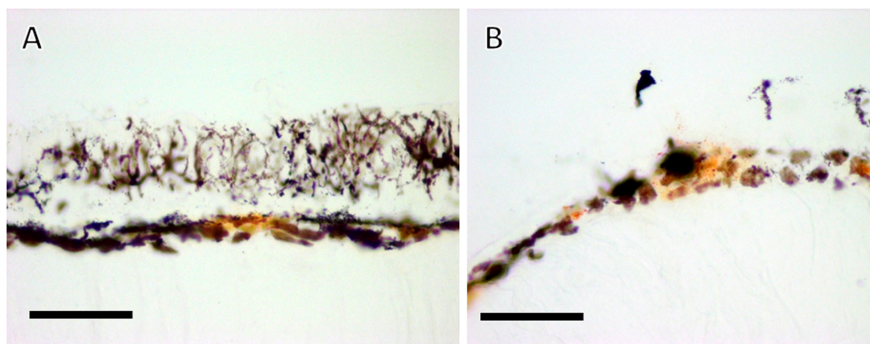
The main difference observed between the three turbot groups of study was the amount of melanophores and xanthophores in the skin (Table 3).

The number of iridophores was similar in the three different groups and they were aligned forming a single layer (Figure 4 A). Regarding the other chromatophores, fish of dark group had a large amount of melanophores and they could be seen even in the epidermis whereas the amount



**Figure 6.** Diagram summarized the structure of skin of turbot. Epidermis (ED), goblet cells (GC), basement membrane (BM), melanophore (ME), xanthophore (XA), iridophore (IR), stratum laxum of dermis (SL), stratum compactum of dermis (SC) and hypodermis (HY).

of xanthophores was scarce (Figure 7 A). Fish of brown-yellowish group showed a high number of xanthophores and the number of melanophores was scarce (Figure 7 B). Fish of brown-grayish group displayed medium amount of melanophores and xanthophores in the pigmentary layer of the dermis (Table 3).

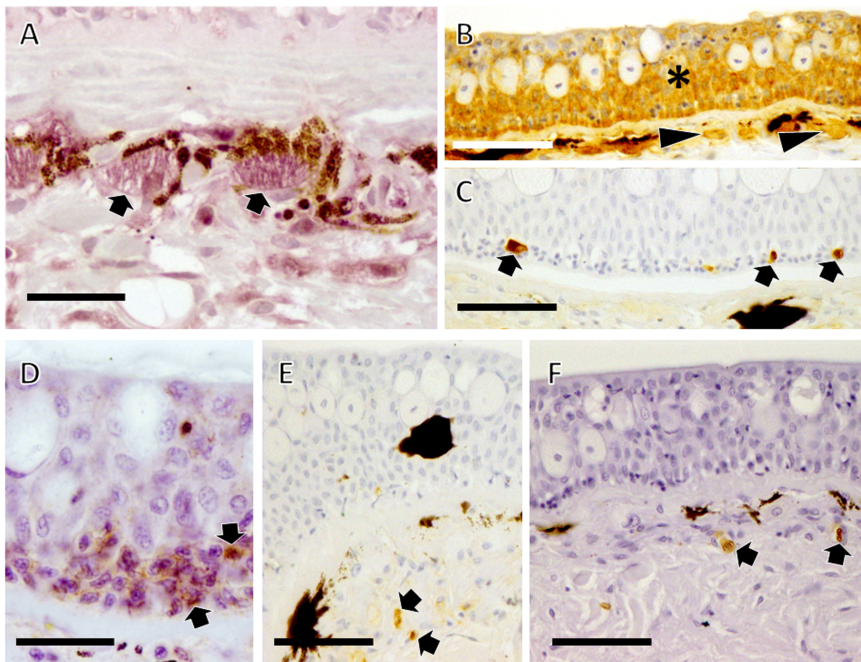


---

**Figure 7.** **A.** Dark turbot with melanophores in the pigmentary layer and in the epidermis. Fresh section. Bar 100  $\mu\text{m}$ . **B.** Skin of brown-yellowish turbot with high amount of xanthophores in the pigmentary layer. Fresh section. Bar 100  $\mu\text{m}$ .

---

Finally, antibody anti-S100 showed strong immunostaining in the crystalline platelets of iridophores of the pigmentary layer, and anti-bovine cytokeratin displayed immunopositivity in the epithelial cells of the epidermis as well as in the iridophores of the pigmentary layer (Figures 8 A and 8 B). Besides, anti-IgM and anti-CD3 showed strong immunostaining in a few cells in the basal epidermis (Figures 8 C and 8 D) and anti-IgM also in superficial dermis (Figure 8 E).






**Figure 8.** **A.** Crystalline platelets in the cytoplasm of iridophores positive against antibody anti-S100 (arrows). IHC. Bar 20  $\mu\text{m}$ . **B.** Epithelial cells (asterisk) and iridophores (arrowheads) stained with the antibody anti-bovine cytokeratin. IHC. Bar 50  $\mu\text{m}$ . **C.** Ig+ cells in the basal epidermis in turbot (arrows). IHC. Bar 50  $\mu\text{m}$ . **D.** Lymphocytes in the basal epidermis in turbot (arrows) immunostained with antibody anti-CD3. IHC. Bar 20  $\mu\text{m}$ . **E.** Ig+ cells in superficial dermis in turbot (arrows). IHC. Bar 50  $\mu\text{m}$ . **F.** Immunostaining cells against antibody anti-lysozyme in the vessels of superficial dermis in turbot (arrows). IHC. Bar 50  $\mu\text{m}$ .

Antibody anti-CD3 revealed the presence of cells morphologically compatible with lymphocytes and antibody anti-IgM showed immunopositivity in cells compatible with lymphocytes and plasma cells. On the other hand, anti-lysozyme antibody stained cells into the vessels in the superficial dermis (Figure 8 F). These cells showed round morphology and the

cytoplasm strongly stained. The rest of antibodies did not show positive results (Table 1).

Ventral skin was similar to dorsal skin, but in the pigmentary layer of the dermis the iridophores were the only type of chromatophores detected.

| Coloration  | Melanophores | Iridophores | Xanthophores |
|---|--------------|-------------|--------------|
| <br><b>brown-yellowish</b> | +            | +++         | +++          |
| <br><b>brown-grayish</b>   | ++           | +++         | ++           |
| <br><b>dark</b>          | +++          | +++         | +            |

**Table 3.** Semiquantitative study of chromatophores in the pigmentary layer of the dermis in the dorsal skin. (+++ large, ++ medium and + scarce amount of chromatophores).

#### 4.4. DISCUSSION

The current work describes the main morphological features of turbot skin at histological and ultrastructural level, as well as the immunohistochemical properties of different cutaneous components.

Although there are inter-species differences in teleost skin (Ferguson 2006), the histology and ultrastructural characteristics of integument in turbot are similar to that described in the majority of teleost species (Arellano and Sarasquete 2006, Guerra et al. 2006, Saadatfar et al. 2010).

The thickness of the epidermis from experimental turbot did not exceed 100  $\mu\text{m}$  in any case. This value is lower than that reported by Groff (2001) for benthonic fish.

Different profiles of epidermal cells have been described along the epidermis in different species of fishes (Hawkes 1974a, Harris and Hunt 1975). These findings are in agreement with those observed in the current study, where different morphologies in the epithelial cells were detected depending on the location in the epidermis. In addition, these cells showed positive immunostaining with anti-cytokeratin antibody according to described in other fish species (Bunton 1993, Schaffeld et al. 2005, Mauger et al. 2009). The intercellular connections like tight junctions and desmosomes observed in turbot have also been reported in plaice and lamprey (Downing and Novales 1971, Roberts et al. 1972, Matoltsy et al. 1984).

Different types of epidermal-secreting cells have been described in various species of fish (Ostrander 2000, Groff 2001) however, only goblet cells were identified in the present work. These mucous cells occupied the entire thickness of the epidermis and the mucus sheet that they produce could help to avoid abrasive

lesions when the fish are partially buried in sand, gravel or sediment or in touch with other surfaces or specimens in fish holding-tanks.

Although chromatophores have been described in fishes (Hawkes 1974b, Fujii 1993, Ferrer et al. 1999, Arellano and Sarasquete 2006, Ferguson 2006, Zarnescu 2007), the histological studies are limited. Among pigment cells, melanophores are the best-known type and their morphological and structural characteristics in turbot were similar to those described in other fish species (Groff 2001)

The main feature of iridophores in the turbot skin was the reflecting platelets in the cytoplasm, which are responsible for their silvery appearance (Fujii 1993). Ferrer et al. (1999) suggested that these platelets are derived from endoplasmic reticulum in *Sparus aurata*. In the current study similar process may occur, since endoplasmic reticulum with different sizes and morphologies could be seen located close to the nucleus. Furthermore, turbot iridophores showed round profile but in *S. aurata* and paddlefish (*Polyodon spathula*) have stellate morphology because they possess cytoplasmic processes (Ferrer et al. 1999, Zarnescu 2007).

In the cytoplasm of xanthophores two different organelles were identified according to the electron density they showed. Similarly, Obika and Meyer-Rochow (1990) described carotenoid vesicles

and immature pterinosomes in the cytoplasm of dermal xanthophores.

Bagnara et al. (1968) defined the dermal chromatophore unit as the combination of xanthophores, iridophores and melanophores following a vertical pattern. In fact, in zebrafish a vertical combination of these pigment cells have been described (Hirata et al. 2005) with xanthophores in the uppermost layer, iridophores in the intermediate layer and melanophores in the basal layer. In the fish analyzed in this experiment a vertical order of dermal chromatophores was observed with melanophores-xanthophore located in the uppermost layer and iridophores in the basal layer.

The distribution and relationships of the turbot chromatophores along the skin may be responsible for skin colour changes observed in the adaptation of the fish to the seabed. Finally, the semiquantitative study performed, showed noticeable differences in number and location of chromatophores in the three groups of turbot. Fujii (1993) and Bolker and Hill (2000), attributed these variations to environment and dietary factors, but further studies would be necessary to know the aspects that affect the cutaneous coloration in turbot.

The panel of antibodies used in the study was chosen to characterize the different components of skin. Firstly, cytokeratin (epithelial cells) and vimentin (mesenchymal cells) are commonly used in mammals to characterize the different cell types populating the skin (Kanitakis 2002, Mauger et al. 2009) as

well as S-100 to mark, among other, different cells in the epidermis (Valcayo 1993, Böni et al. 1997, Kanitakis 2002). In the current study, positive results were obtained with cytokeratin and S-100 antibodies that showed immunopositivity in epithelial cells and iridophores. Secondly, the chromatophores are derived from neural crest as well as glia and neurons (Quigley et al. 2004, Quigley et al. 2005), therefore, a battery of antibodies which immunostained neural cells in mammals were tested (Enolase, GFAP and N-Cadherin). Unfortunately, in turbot cross reactivity was not observed with these antibodies. Finally, lysozyme, IgM and CD3 were included to assess the immune cells present in healthy skin and all these antibodies give positive immunostaining.

In summary, the characterization of histological, ultrastructural and immunohistochemical features of the skin in healthy turbot have been assessed in the current study. This work has provided news insights that are basics to understand the behaviour of the skin and apply this knowledge in the early diagnoses and prevention of cutaneous diseases.

#### **4.5. REFERENCES**

Arellano JM, Sarasquete C (2006). Atlas histológico del lenguado senegalés: "Solea senegalensis" (Kaup, 1858). Ed: Arellano JM, Sarasquete C. Madrid, Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Bagnara JT, Taylor JD, Hadley ME (1968). The dermal chromatophore unit. *Journal of Cell Biology* 38:67-79.

Bagnara JT, Hadley ME (1973). Chromatophores and color change; the comparative physiology of animal pigmentation. Englewood Cliffs, Prentice-Hall, New Jersey.

Bolker JA, Hill CR (2000). Pigmentation development in hatchery-reared flatfishes. *Journal of Fish Biology* 56:1029-1052.

Böni R, Burg G, Doguoglu A, Ilg EC, Schäfer BW, Müller B, Heizmann CW (1997). Immunohistochemical localization of the Ca<sup>2+</sup> binding S100 proteins in normal human skin and melanocytic lesions. *The British Journal of Dermatology* 137:39-43.

Bunton TE (1993). The immunocytochemistry of cytokeratin in fish tissues. *Veterinary Pathology* 30:418-425.

Corrales J, Ullal A, Noga EJ (2009). Lateral line depigmentation (LLD) in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Journal of Fish Diseases* 32:705-712.

Downing SW, Novales RR (1971). The fine structure of lamprey epidermis. I. Introduction and mucous cells. *Journal of Ultrastructure Research* 35:282-294.

Elliot DG (2000). Integumentary system. In: *The handbook of experimental animals*. Ed: Ostrand GK. Academic press, London. pp. 95-107.

Ferguson HW (2006). Systemic pathology of fish. A text and atlas of normal tissues in teleost and their responses in disease. Ed: Ferguson HW, Second edition, Scotian Press, London, UK.

Ferrer C, Solano F, Zuasti A (1999). Ultrastructural and biochemical analysis of epidermal xanthophores and dermal chromatophores of the teleost *Sparus aurata*. *Histology and Histopathology* 14:383-390.

Fujii R (1993). Coloration and chromatophores. In: *The physiology of fishes*. Ed: Evans DH. Boca Raton: CRC Press, Florida pp. 535-562.

Fujii R (2000). The regulation of motile activity in fish chromatophores. *Pigment Cell Research* 13:300-319.

Goda M, Ohata M, Ikoma H, Fujiyoshi Y, Sugimoto M, Fujii R (2011). Integumental reddish-violet coloration owing to novel dichromatic chromatophores in the teleost fish, *Pseudochromis diadema*. *Pigment Cell and Melanoma Research* 24:614-617.

Groff JM (2001). Cutaneous biology and diseases of fish. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice* 4:321-411.

Guerra RR, Santos NP, Cecarelli P, Mangetti AJ, Silva JR, Hernández-Blázquez FJ (2006). Stratum adiposum, a special structure of the african catfish skin (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822). *Anatomia Histologia Embriologia* 35:144-146.

Harris J, Hunt S (1975). The fine structure of the epidermis of two species of salmonid fish, the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and the brown trout (*Salmo trutta* L.). *Cell and Tissue Research* 163:535-543.

Hawkes JW (1974a). The structure of fish skin. I. General organization. *Cell and Tissue Research* 149:147-158.

Hawkes JW (1974b) The structure of fish skin. II. The chromatophore unit. *Cell and Tissue Research* 149:159-172

Hirata M, Nakamura K, Kondo S (2005). Pigment cell distributions in different tissues of the zebrafish, with special reference to the striped pigment pattern. *Developmental Dynamics* 234:293-300.

Kanitakis J (2002). Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *European Journal of Dermatology* 12:390-399.

Magi GE, López-Romalde S, Magariños GE, Lamas J, Toranzo AE, Romalde L (2009). Experimental *Pseudomonas anguilliseptica* infection in turbot *Psetta maxima* (L.): a histopathological and immunohistochemical study. *European Journal of Histochemistry* 53:73-80.

Matoltsy AG, Bereiter-Hahn J (1984). Biology of the integument. Ed: Matoltsy AG, Richards KS, Bereiter-Hahn J, Springer-Verlag, Berlin.

Mauger PE, Labbé C, Bobe J, Cauty C, Leguen I, Baffet G, Le Bail PY (2009). Characterization of goldfish fin cells in culture: some evidence of an epithelial cell profile. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 152:205-215.

Noga EJ, Udomkusonsri P (2002). Fluorescein: a rapid, sensitive, nonlethal method for detecting skin ulceration in fish. *Veterinary Pathology* 39:726-731.

Obika M, Meyer-Rochow VB (1990). Dermal and epidermal chromatophores of the Antarctic teleost *Trematomus bernacchii*. *Pigment and Cell Research* 3:33-37.

Ostrander GK (2000). The laboratory fish. The handbook of experimental animals. Ed: Ostrander GK. Academic press, London.

Prum RO, Torres RH (2003). Structural colouration of avian skin: convergent evolution of coherently scattering dermal collagen arrays. *The Journal of Experimental Biology* 206:2409-2429.

Quigley IK, Turner JM, Nuckels RJ, Manuel JL, Budi EH, MacDonald EL, Parichy DM (2004). Pigment pattern evolution by differential deployment of neural crest and post-embryonic melanophore lineages in *Danio* fishes. *Development* 131:6053-6069.

Quigley IK, Manuel JL, Roberts RA, Nuckels RJ, Herrington ER, MacDonald EL, Parichy DM (2005). Evolutionary diversification of pigment pattern in *Danio* fishes: differential *fms* dependence and stripe loss in *D. albolineatus*. *Development* 132:89-104.

Rakers S, Gebert M, Uppalapati S, Meyer W, Maderson P, Sell AF, Kruse C, Paus R (2009). 'Fish matters': the relevance of fish skin biology to investigative dermatology. *Experimental dermatology* 4:313-324.

Roberts RJ, Young H, Milne JA (1972). Studies on the skin of plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *Journal of Fish Biology* 4:87-98.

Roberts RJ (2001). *Fish pathology*. Ed: Roberts RJ, Third edition, W.B. Saunders, Edinburgh, UK.

Saadatfar Z, Shahsavani D, Fatemi FS (2010). Study of epidermis development in sturgeon (*Acipenser persicus*) larvae. *Anatomia Histologia Embriologia* 39:440-445.

Schaffeld M, Bremer M, Hunzinger C, Markl J (2005). Evolution of tissue-specific keratins as deduced from novel cDNA sequences of the lungfish *Protopterus aethiopicus*. *European Journal of Cell Biology* 84:363-377.

Toranzo AE, Magariños B, Romalde JL (2005). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* 246:37-61.

Valcayo AM (1993). La proteína S100 en los tumores melanocíticos de la piel. Universidad Complutense de Madrid. Tesis Doctoral.

van Gelderen R, Carson J, Nowak B (2009). Effect of extracellular products of *Tenacibaculum maritimum* in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* 32:727-731.

Vilar P, Faílde LD, Bermúdez R, Vigliano F, Riaza A, Silva R, Santos Y, Quiroga MI (2012). Morphopathological features of a severe ulcerative disease outbreak associated with *Tenacibaculum maritimum* in cultivated sole, *Solea senegalensis* (L.). *Journal of Fish Diseases* 35:437-445.

Zarnescu O (2007). Ultrastructure of the skin melanophores and iridophores in paddlefish, *Polyodon spathula*. *Micron* 38:81-84.

**CAPÍTULO 5.**  
**MORPHOPATHOLOGICAL FEATURES OF A  
SEVERE ULCERATIVE DISEASE OUTBREAK  
ASSOCIATED WITH *Tenacibaculum maritimum* IN  
CULTIVATED SOLE, *Solea senegalensis* (L.)**



## **5.1. INTRODUCTION**

Modern day production of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, L.) in Spain is very limited (188 t), and mainly located in Galicia (Northwest Spain), with a total production of 150 t (APROMAR 2010). Knowledge of the physiological and nutritional requirements for the culture of Senegalese sole is gradually being attained, while the preservation of the health status of new and old species maintained in captivity remains a high priority (Le Breton 1999, Austin and Austin 2007).

As occurs in other areas of animal production, infectious diseases are an ever-present hazard in aquaculture, with the potential to cause heavy stock losses or to reduce the commercial value of the fish as food for humans. Some external anomalies commonly encountered in flat fish are eroded fins and erosions/ulcers in the skin. Ulcerative skin lesions have been widely reported in both wild and cultivated fish, and their etiopathology has been related to changes in environmental conditions and infectious diseases (Noga 2000). Most agents isolated from these lesions such as water mould fungi (e.g. *Oomycetes*), bacteria (e.g. *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp., *Flexibacter* spp., *Tenacibaculum* spp), and virus (e.g. *Lymphocystis* spp.) (Bernardet et al. 1990, Handlinger et al. 1997, Mastan and Qureshi 2001, Cepeda and Santos 2002, Piñeiro-Vidal et al. 2008) are opportunistic pathogens that are ubiquitous in the environment or may be present in the skin of healthy fish and can quickly colonize this area and cause diseases. The occurrence of multiple pathogens in both the lesion itself and in different fish species suggest that some common initiating event may be weakening the

resistance of fish, leading to ulceration (Noga 2000). Epidermal damage not only provides access for infectious agents, but it also produces an osmotic stress that can be life threatening. The close relationship between skin damage and microbial colonization often makes it difficult to identify the initiating cause of a skin ulcer (Noga 2000).

The aim of the present study is to describe an ulcerative syndrome observed in cultivated sole (*S. senegalensis*) macroscopically characterized by the presence of extensive skin ulcers as main clinical signs. The lesions were studied by histological, scanning electron microscopy (SEM), microbiological and molecular methods.

## **5.2. MATERIALS AND METHODS**

### **5.2.1. Sampling of diseased fish**

A total of 10 one-year old *S. senegalensis* (mean  $\pm$  SD;  $15 \pm 0.5$  cm length) cultured in a farm in the Northwest of Spain were collected from the same hatchery tank during May 2005 and subjected to microbiological and morphopathological studies. These fish had erosion and ulceration of the skin surface. For sampling, fish were euthanized by overexposure to Tricaine methane sulphonate (MS222) (Sigma-Aldrich, Germany) and necropsied.

### **5.2.2. Isolation and identification of bacteria**

Samples from kidney and skin lesions of sole with ulcerative skin lesions were cultured on tryptone soy Agar (Oxoid), supplemented with 1% NaCl (TSA-1), Thiosulphate Citrate Bile Sucrose (TCBS) Agar (Oxoid), Marine Agar (MA; Cultimed, Panreac Química Sau, Barcelona, Spain) and *Flexibacter maritimus* Medium (FMM) (Pazos et al. 1996) and incubated at 25°C for 24-48 h. Wet mount preparations and Gram-stained smears from kidney and ulcers were examined using a light microscope.

Pure cultures of the isolates obtained on MA, FMM and TSA-1 agar plates were identified using morphological, physiological and biochemical tests and API systems (API 20E and API ZYM) (bioMérieux) as previously described (Santos et al. 1993, Bernardet et al. 2002, Cepeda and Santos 2002).

Serological identification was performed using a slide agglutination test (Santos et al. 1995). The test was carried out using both formalin-killed cells (FKC) and “O” antigens and rabbit whole cell antiserum raised against the reference strain of *T. maritimum* NCIMB2153 and four Spanish isolates LL01.8.3.8, LPV 1.7, LMO2.7.5.4 and Q0210.1.2, representing the serotypes O1, O2, O3 and O4, respectively. Strong and rapid agglutination was registered as a positive result and no, or only a weak agglutination occurring after 1 to 2 min as a negative reaction. Auto-agglutination (spontaneous agglutination) control was evaluated by mixing equal volumes of antigen suspension and sterile saline solution instead of antiserum.

### **5.2.3. Nested PCR-detection of *Tenacibaculum maritimum* in fish tissues**

DNA was extracted from kidney and skin tissues from diseased fish using Dynabeads DNA DIRECT™ system (Dyna, Oslo, Norway) following the manufacturer's instructions, and we used a nested PCR amplification in order to detect the presence of *T. maritimum* as the causative agent of the disease. Nested-PCR amplifications were carried out using the commercial kit Ready-to-go PCR beads (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA) as previously described (Cepeda et al. 2003). The universal primers 20F and 1500R and the species-specific primers MAR1 and MAR2 were used for PCR1 and PCR2, respectively. The amplified products were analyzed using vertical agarose electrophoresis and the methylene blue staining method (VAGE/MeB) (Cepeda and Santos 2000).

### **5.2.4. Histopathological examination**

Samples of normal and ulcerated skin, gills, kidney, liver, spleen, and intestine of diseased *S. senegalensis* were fixed in both 10% neutral buffered formalin and Bouin's solution for at least 18-24 h, embedded in paraffin wax, sectioned at 2-3 µm in thickness, and stained with hematoxylin-eosin (H-E) for light microscopy (LM) observation. For ultrastructural studies, skin samples were fixed in 2.5% glutaraldehyde with 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.3) and post fixed in 1% osmium tetroxide and dehydrated in ethanol solutions. Samples were routinely processed for examination under a JEOL JSM-6360LV scanning electron microscope.

### **5.3. RESULTS**

#### **5.3.1. Description of the outbreak**

Ulcerative skin disease of *S. senegalensis* occurred at a farm located in Galicia (Northwest of Spain) during May 2005. The disease caused approximately 20% of morbidity and about 0.1% of mortality per month. The main clinical signs of diseased fish were erratic swimming, anorexia, abdominal distension and ulcerative skin lesions. No lesions were observed in internal organs. Light microscopy of wet mount preparation from all external lesions and one of the kidney tissues examined revealed the presence of filamentous bacteria, motile by gliding.

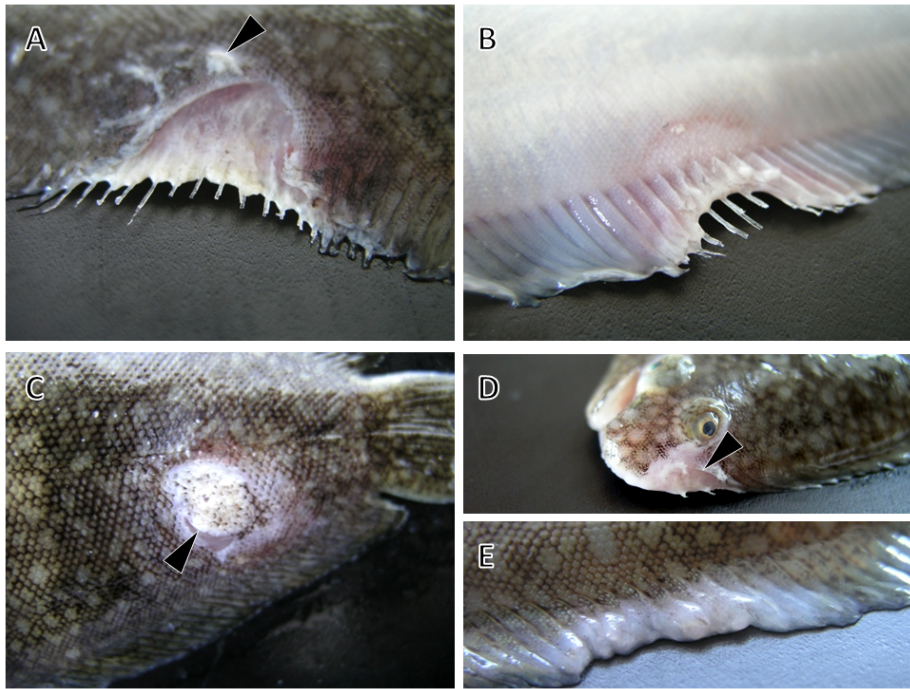
#### **5.3.2. Bacterial characterization and PCR detection in fish tissues**

A predominant colony type grew on FMM plates from external lesions of all affected fish examined and from kidney tissues of 6 of 10 fish analyzed. Colonies were flat, pale-yellow with uneven edges, presented strong adherence to the medium and absorbed Congo red. The phenotypic tests showed that bacterial isolates were Gram-staining-negative, long slender rods with gliding motility. They produced catalase and cytochrome oxidase and reduced nitrate but did not produce hydrogen sulphide or flexirubin-type pigments. All the isolates exhibited the same enzymatic profile described for the reference *T. maritimum* strain NCIMB 2153 in API ZYM galleries. A strong positive agglutination with the NCIMB 2153 and LL01.8.3.8 (serotype O1) antisera was observed using the FKC and “O” antigens, but no

reactivity was recorded when the other antisera and “O” antigens were employed. The electrophoretic analysis of PCR products obtained using as a template DNA obtained from tissues of severely affected fish showed a single band of 400 bp, as expected for a *T. maritimum* strain. Occasionally, other bacterial species were recovered on FMM, MA, TSA-1 and the selective medium TCBS from skin samples. These cultures were identified as *Vibrio splendidus* biotype I and *Aeromonas* spp. on the basis of the results of conventional morphological, physiological and biochemical test and API 20E system.

### **5.3.3. Macroscopic observations**

Macroscopically, severe ulcerative skin lesions were observed in eight of the ten fish specimens studied. These lesions were sharply demarcated and wedge shaped with the wider base to the surface of the skin and the narrow side reaching the muscle tissues. Ulcers measured  $1.5 \pm 0.5$  cm on the surface and deepened towards the muscle showing necrosis of the tissues (Figures 1 A and 1 B). In some of these ulcers flaps of necrotic epidermis were observed and the spines were exposed and considerably shortened (Figures 1 A and 1 B). On the blind side a hyperaemic halo could be noticed around the edge of the ulcer (Figure 1 B).



---

**Figure 1.** Macroscopic images of lesions in the affected soles **A.** Wedge-shaped ulcer located in the dorsal fin. Flap of necrotic epidermis associated with the damage (arrowhead). **B.** Ventral side with a wedge-shaped ulcer on the dorsal fin. **C.** Circular ulcer located on the trunk of the fish surrounded by evident depigmentation. Flap of necrotic epidermis associated with the damage (arrowhead). **D.** The small ulcer located on the dorsal fin close to eye and mouth (arrowhead). **E.** Mild erosion and thickening of the dorsal fin.

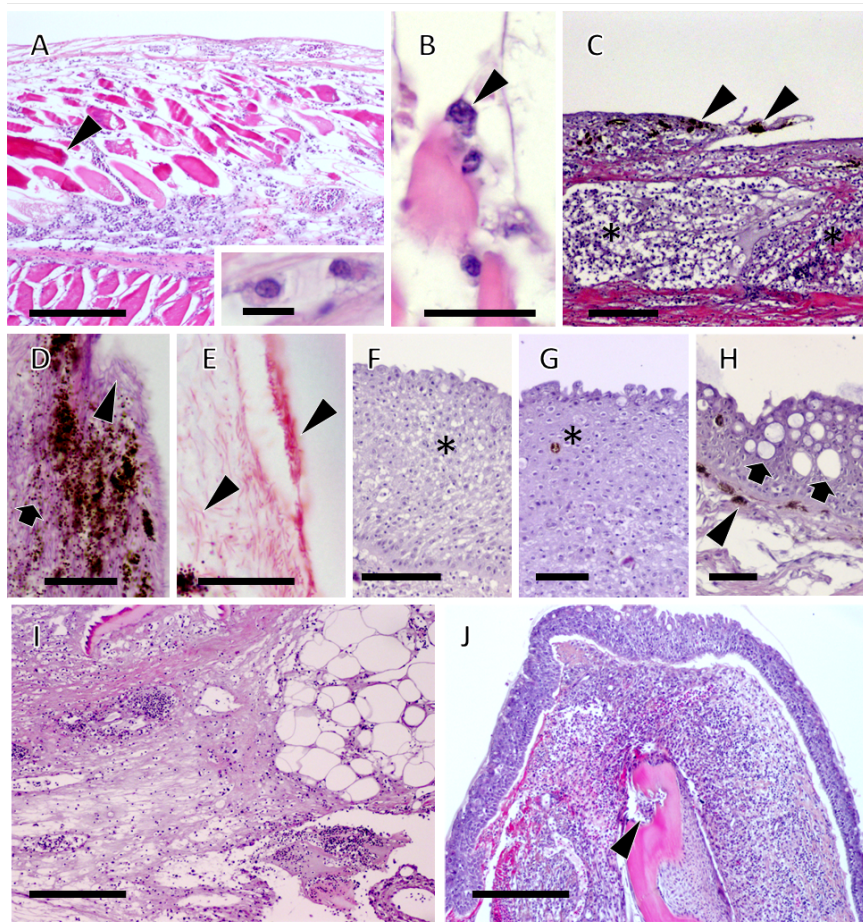
---

These types of ulcers were located along the dorsal and ventral fins but were more typical in the middle of the ventral fin. One of the 10 fish analyzed showed an ulcerative lesion in the trunk, circular in shape, (1 cm in diameter approximately) and a pale well-defined edge (Figure 1 C). In this ulcer a great flap of necrotic epidermis was also seen. All these ulcers displayed a necrotic zone affecting the epidermis and dermis and extending into the muscle layers. In one case, mild lesions were observed in the dorsal fin next to the head (Figure 1 D). In addition, there were early lesions characterized by small whitish

erosions and shortening of the rays in both dorsal and ventral fins (Figure 1 E).

#### **5.3.4. Light microscopic observations**

In severe ulcers, there was a complete loss of epidermis, dermis and hypodermis, leaving the muscle exposed. Extensive necrosis was observed affecting the superficial muscle bundles that extended into the deep layers of muscle (Figure 2 A). Muscle cells showed a hyaline degeneration consisting of fragmented eosinophilic sarcoplasm, surrounded by mild to moderate inflammatory response with presence of macrophage cells (Figure 2 A, inset). In these sites, blood vessels were completely filled with erythrocytes and, occasionally, extravasation of blood cells could be detected (Figure 2 A). In some cases macrophages engulfing necrotic muscle cells were observed (Figure 2 B). At the periphery of ulcers, scale pockets appeared devoid of scales and with oedema and numerous inflammatory cells inside, the epithelial lining was lost, and the melanin in melanophores appeared to be aggregated, forming punctated spots grouped in the pigmentary layer of the dermis (Figure 2 C). In the dermis, a great amount of Gram-negative filamentous bacteria could be seen interspersed with melanin (Figures 2 D and 2 E). Epithelial cells were separated and showed different degrees of spongiosis along the epidermis (Figure 2 F).



**Figure 2.** Histopathology of lesions in the affected sole. **A.** Severe ulcer in skin with inflammatory cells between muscles. Muscle cells show hyaline degeneration (arrowhead). H-E. Bar 200  $\mu$ m. **Inset:** Detail of macrophages located in ulcerative lesions in skin. Bar 10  $\mu$ m. **B.** Macrophage phagocytizing muscle cell debris (arrowhead). H-E. Bar 20  $\mu$ m. **C.** Dilatation of scale pockets with scale loss and evident inflammatory response (asterisks) and aggregated melanophores (arrowheads). H-E. Bar 100  $\mu$ m. **D.** Ulcerative lesion with large amount of filamentous bacteria (arrowhead) and melanin dispersed between the damaged tissues (arrow). H-E. Bar 20  $\mu$ m. **E.** Filamentous Gram negative bacteria (arrowheads). Gram stain. Bar 20  $\mu$ m. **F.** Epidermis showing evident spongiosis (asterisk). H-E. Bar 50  $\mu$ m. **G.** Hyperplasia of epithelial cells (asterisk). H-E. Bar 50  $\mu$ m. **H.** Hyperplasia of mucous cells in the epidermis (arrows) and aggregated melanophores (arrowhead). H-E. Bar 50  $\mu$ m. **I.** Severe inflammatory response and haemorrhage. H-E. Bar 200  $\mu$ m. **J.** Osteolysis in the bone of frayed fin (arrowhead). H-E. Bar 200  $\mu$ m.

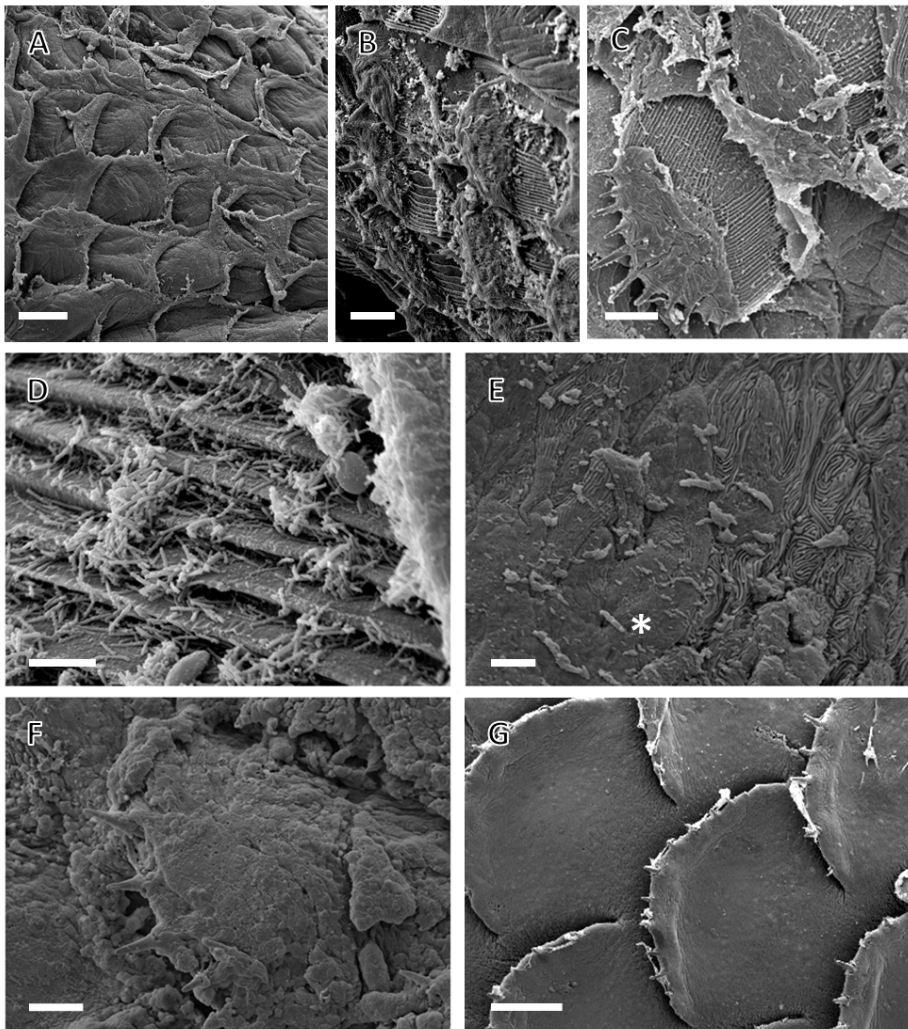
An increase in epidermal thickness, as a result of Malpighian and mucous cell hyperplasia was also observed (Figures 2 G and 2 H).

Dermis and hypodermis below eroded epidermis in fins showed severe inflammatory response and haemorrhage extending into the adjacent healthy area (Figure 2 I). At these sites, osteolysis of frayed fin bone was noted (Figure 2 J). Microscopic changes were not detected in the other organs analyzed in the present study.

Regardless of the stage of disease development, bacteria were always observed in the dermis (Figures 2 D and 2 E) but not in the epidermis, hypodermis, muscle (Figures 2 F, 2 G, 2 H and 2 I) or internal organs (data not shown).

#### **5.3.5. Scanning electron microscopy**

In areas with severe lesions, evident de-scaling or scales devoid of epithelium with the surface exposed could be observed (Figures 3 A and 3 B). A characteristic feature of these lesions was the heavy erosion in the central area of the scale where the fibroid bone was completely exposed to the environment (Figure 3 C). The lesions first affected the epithelium of the middle of the scale and later progressed to its edges. In the areas without epithelium the presence of a large number of groups of filamentous bacteria located in the surface of scales and between the radii of scales were noted (Figure 3 D).



---

**Figure 3.** SEM of skin of affected soles. **A.** Area with evident de-scaling. Bar 100  $\mu\text{m}$ . **B and C.** Severe ulceration in the central area of the scale. Bar 100  $\mu\text{m}$ . **D.** Large number of groups of filamentous bacteria located on the surface of scales and between the radii of scales. Bar 10  $\mu\text{m}$ . **E.** Early lesions in the skin with a slight swelling of the epidermis. Note the loss of microridges on the surface of some epithelial cells (asterisk). Bar 100  $\mu\text{m}$ . **F.** Irregular appearance of the surface of epidermis. Bar 100  $\mu\text{m}$ . **G.** Skin of healthy fish showing homogeneous surface of epidermis without lesions. Bar 200  $\mu\text{m}$ .

---

At the periphery of the lesion, the skin surface showed an irregular appearance, owing to inflammation, flaking and the loss of epidermal cell microridges (Figures 3 E and 3 F). The surface of healthy skin showed a homogeneous image with the scales overlapping and covered by an intact epithelial layer (Figure 3 G).

#### **5.4. DISCUSSION**

The present study describes a severe ulcerative disease outbreak that affected Senegalese sole cultured in the Northwest of Spain. Macroscopic observation, in addition to light microscopy and scanning electron microscopy, were used to characterize the ulcerative and necrotic lesions. The use of bacteriological, molecular and serological methods allowed the identification of the causative agent of the ulcer disease as *Tenacibaculum maritimum* (serotype O1). One of the most surprising findings of this study was the extensive and severe lesions observed along the dorsal and ventral fins of most of the fish examined, probably as a result of localized bacterial proliferation, with no macroscopic evidence for the development of a generalised septicaemia. Clinical signs and gross pathology associated with *T. maritimum* and *Tenacibaculum soleae* infections, have been previously described in several wild and cultured fish both in natural and experimental infections, and the findings show some similarities with this study (McVicar and White 1979, Baxa et al. 1986, Devesa et al. 1989, Alsina and Blanch 1993, Chen et al. 1995, Handler et al. 1997, Ostland et al. 1999, Cepeda and Santos 2002, van Gelderen et al. 2011).

Unlike other skin conditions that occur with a high number of ulcers distributed anywhere on the body surface (Wiklund and Bylund 1993, Roberts 2001, Austin and Austin 2007, Bruno et al. 2007, Kodama et al. 2007), in the present study no more than 2-3 severe ulcerative lesions, mainly located in the fins, were observed in the same fish. Other gross pathological findings previously recorded (Carson et al. 1992, Handler et al. 1997, van Gelderen et al. 2011) in Atlantic salmon naturally or experimentally infected with *T. maritimum*, such as erosion of the oral cavity and jaws, eye damage or gill necrosis, were not observed in the current study, even in severely affected sole. These findings are consistent with the chronic form of the disease described in Atlantic salmon by van Gelderen et al. (2011) using a dose dependent infectious trial. As these authors indicated, damage to the skin surface, particularly in parts in constant movement or areas where abrasion could easily arise where fish are held captive, coupled with optimal conditions for bacterial growth could facilitate the colonization of the epithelium by *T. maritimum* and, subsequently, its penetration to subepithelial tissues. Moreover, following the criteria of Law (2001) for the differential diagnosis of ulcerative lesions in fish, the wedge shape of the ulcers observed in the current study is also indicative of lesions caused on the surface of the skin and progressing to deeper layers, so called “outside-in” skin lesion.

With regard to morphopathological examination, the muscle cells showed evident degeneration and necrosis in superficial and deep layers, and loss of epidermis and dermis located above the muscle was also observed. These degenerative changes lead to loss of support of the epithelium and the formation of a necrotic skin flap. Similar

findings have been described in Atlantic salmon (van Gelderen et al. 2011) and in ayu (*Plecoglossus altivelis*) (Miwa and Nakayasu 2005) experimentally infected by immersion with *T. maritimum* and *Flavobacterium psychrophilum*, respectively. However, unlike what was observed in Atlantic salmon infected with *T. maritimum* (van Gelderen et al. 2011), no replacement of the muscle fibres by fat was noted in the present study, regardless of the stage of lesion development. Moreover, a mild to moderate inflammatory response surrounding necrotized muscle cells, with the presence of macrophages phagocytizing muscle cells debris, was observed in sole with severe ulcers. Contrary to this, Handlinger et al. (1997) indicated that the muscle of salmonids naturally infected with *T. maritimum*, only showed congestion and the inflammatory reaction to the bacterium in severe ulcers was minimal. These discrepancies could be due to differences in immune response among fish species or because the lesions analyzed in both studies were at different stages of development.

At the periphery of the ulcers, in addition to the epithelial loss, we observed contracted melanophores aggregated in the pigmentary layer of the dermis. This melanophores aggregation may produce a local depigmentation, explaining the whitish appearance of the skin lesions observed in fish affected by tenacibaculosis. A similar finding has been previously reported by Corrales et al. (2009), studying lateral line depigmentation (LLD) in channel catfish (*Ictalurus punctatus*, R).

Regardless of the degenerative changes observed in the muscle and hypodermis of diseased sole, bacteria were only observed in the dermis and not in the muscle or in the hypodermis. However, a severe

inflammatory response and haemorrhage extending into the adjacent healthy area was observed in the dermis and hypodermis below eroded fins. These histological findings together with the isolation and PCR detection of the bacteria in samples of skin and kidney tissues, suggest that once the bacteria reach the dermis, probably through eroded epidermis, its entry to subjacent tissues may be facilitated by the production of extracellular enzymes able to degrade connective tissues. Previous studies have demonstrated that extracellular products (ECP) produced by *T. maritimum* caused necrosis in the inoculated fish and was highly toxic (Baxa et al. 1988, Carson et al. 1992, Pazos 1997, van Gelderen et al. 2009). The ECP also causes cell necrosis in the internal organs of inoculated fish and may change the immune response of the host (van Gelderen et al. 2009).

The other skin lesions observed in the current study are considered as non-specific but can indicate early stages of cutaneous problems. Mild and non-specific lesions in the periphery of ulcers like hyperplasia of epithelial and mucous cells were detected in the epithelium. In general, these types of lesions are related to normal inflammatory response against any agent and increase the protection of the fish epidermis (Shephard 1994, Lee et al. 1996, Ferguson 2006) or are involved in the restoration of the normal structure of skin (Shephard 1994). Moreover, the morphology and the degenerative processes found as spongiosis or hydropic degeneration and deep ulcers are frequently observed in the histopathology studies of skin diseases in fish (McVicar and White 1979, Bodammer 2000).

One of the interesting findings of the present study was derived from SEM observations of samples from severe lesions. A characteristic feature of these samples was the heavy ulceration of the central area of the scale where the fibroid bone was completely exposed to the environment as well as the presence of large number of groups of filamentous bacteria located on the surface and between the radii of scales. The scales, a dermal component of the bone of teleost fish, represent a ready source of calcium, which are considered important in the growth of flavobacteria (Hikida et al. 1979). The calcium from scales may be reabsorbed in preference to the skeletal reserves, during starvation periods or pre-spawning (Ferguson 2006), and it is tempting to speculate that *T. maritimum* can attach to scale surface, and utilize all the available nutrients (proteins, calcium...) of its host to survive and/or proliferate. The mucus of turbot, which lacks bactericidal activity against *T. maritimum* (Magariños et al. 1995, Pazos 1997), has also been suggested as a reservoir of nutrients that allow bacterial survival and proliferation (Avendaño-Herrera et al. 2006). Also, the extensive necrosis and tissue destruction seen in the present study in Senegalese sole as well as in other marine fish species infected with *T. maritimum* suggests that this bacterium produces strong tissue-destroying enzymes. Further studies are needed in order to clarify the possible role of extracellular enzymes in the pathogenesis of tenacibaculosis caused by *T. maritimum* in *S. senegalensis*.

## **5.5. REFERENCES**

Alsina M, Blanch AR (1993). First isolation of *Flexibacter maritimus* from cultivated turbot (*Scophthalmus maximus*). Bulletin European Association Fish Pathology 13:157-160.

APROMAR (2010). La Acuicultura Marina de Peces en España 2010, Chiclana, Cádiz. Disponible desde <http://www.apromar.es/Informes/informe%202010/Informe-APROMAR-2010.pdf>.

Austin B, Austin DA (2007). Bacterial fish pathogens: diseases of farmed and wild fish. Praxis Publishing Ltd, Chichester, UK, Dordrecht.

Avendaño-Herrera R, Toranzo AE, Magariños B (2006). Tenacibaculosis infection in marine fish caused by *Tenacibaculum maritimum*: a review. Diseases of Aquatic Organisms 71:255-266.

Baxa DV, Kawai K, Kusuda R (1986). Characteristics of gliding bacteria isolated from diseased cultured flounder, *Paralichthys olivaceous*. Fish Pathology 21:251-258.

Baxa DV, Kawai K, Kusuda R (1988). *In vitro* and *in vivo* activities of *Flexibacter maritimus* toxins. Bulletin of Marine Sciences and Fisheries, Kochi University 10:1-8.

Bernardet JF, Campbell AC, Buswell JA (1990). *Flexibacter maritimus* is the agent of “black patch necrosis” in Dover sole in Scotland. Diseases of Aquatic Organisms 8:233-237.

Bernardet JF, Nakagawa Y, Holmes B (2002). Proposed minimal standards for describing new taxa of the family Flavobacteriaceae and emended description of the family. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52:1049-1070.

Bodammer JE (2000). Some new observations on the cytopathology of fin erosion disease in winter flounder *Pseudopleuronectes americanus*. Diseases of Aquatic Organisms 40:51-65.

Bruno D, Crumlish M, LaPatra S, Noguera P, Verner-Jeffreys D (2007). Workshop on salmonid skin diseases. In: pathologists EAFP. Ed: 13th International Conference on Fish and Shellfish Diseases, Grado, Italy.

Carson J, McCosh P, Schmidtke L (1992). Pathogenicity of *Flexibacter maritimus* in rainbow trout. In: Barriers and breakthroughs. Proceedings of the SALTAS Research Review Seminar. Ed: Valentine P, SALTAS P/L, Hobart, Tasmania, pp 89-99.

Cepeda C, Santos Y (2000). Rapid and low-level toxic PCR-based method for routine identification of *Flavobacterium psychrophilum*. *International Microbiology* 3:235-238.

Cepeda C, Santos Y (2002). First isolation of *Flexibacter maritimus* from farmed Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) in Spain. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 22:388-392.

Cepeda C, García-Márquez S, Santos Y (2003). Detection of *Flexibacter maritimus* in fish tissue using nested PCR amplification. *Journal of Fish Diseases* 26:65-70.

Chen ME, Henry-Ford D, Groff JM (1995). Isolation and characterization of *Flexibacter maritimus* from marine fishes of California. *Journal of Aquatic Animal Health* 7:318-326.

Corrales J, Ullal A, Noga EJ (2009). Lateral line depigmentation (LLD) in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Journal of Fish Diseases* 32:705-712.

Devesa S, Barja JL, Toranzo AE (1989). Ulcerative skin and fin lesions in reared turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Fish Diseases* 12:323-333.

Ferguson HW (2006). Systemic pathology of fish. A text and atlas of normal tissues in teleost and their responses in disease. Ed: Ferguson HW, Second edition, Scotian Press, London, UK.

Handler J, Soltani M, Percival S (1997). The pathology of *Flexibacter maritimus* in aquaculture species in Tasmania, Australia. *Journal of Fish Diseases* 20:159-168.

Hikida M, Wakabayashi H, Egusa S, Masumura K (1979). *Flexibacter* sp., a gliding bacterium pathogenic to some marine fishes in Japan. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 45:421-428.

Kodama H, Denso, Nakagawa T (2007). Protection against atypical *Aeromonas salmonicida* infection in carp (*Cyprinus carpio* L.) by oral administration of humus extract. *The Journal of Veterinary Medical Science* 69:405-408.

Law M (2001). Differential diagnosis of ulcerative lesions in fish. *Environmental Health Perspectives* 109:681-686.

Le Breton AD (1999). Mediterranean finfish pathologies: Present status and new developments in prophylactic methods. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 19:250-253.

Lee TH, Hwang PP, Lin HC (1996). Morphological changes of integumental chloride cells to ambient cadmium during the early development of the teleost, *Oreochromis mossambicus*. *Environmental Biology of Fishes* 45:95-102.

Magariños B, Pazos F, Santos Y, Romalde JL, Toranzo AE (1995). Response of *Pasteurella piscicida* and *Flexibacter maritimus* to skin mucus of marine fish. *Diseases of Aquatic Organisms* 21:103-108.

Mastan SA, Qureshi TA (2001). Role of bacteria in the epizootic ulcerative syndrome (EUS) of fishes. *Journal of Environmental Biology* 22:187-192.

McVicar AH, White PG (1979). Fin and skin necrosis of cultivated Dover sole *Solea solea* (L.). *Journal of Fish Diseases* 2:557-562.

Miwa S, Nakayasu C (2005). Pathogenesis of experimentally induced bacterial cold water disease in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 67:93-104.

Noga EJ (2000). Skin ulcers in fish: *Pfiesteria* and other etiologies. *Toxicologic Pathology* 28:807-823.

Ostland VE, LaTrace C, Morrison D, Ferguson HW (1999). *Flexibacter maritimus* associated with a bacterial stomatitis in Atlantic salmon smolts reared in net-pens in British Columbia. *Journal of Aquatic Animal Health* 11:35-44.

Pazos F, Santos Y, Macías AR, Núñez S, Toranzo AE (1996). Evaluation of media for the successful culture of *Flexibacter maritimus*. *Journal of Fish Diseases* 19:193-197.

Pazos F (1997). "Flexibacter maritimus": estudio fenotípico, inmunológico y molecular. Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain.

Piñeiro-Vidal M, Riaza A, Santos Y (2008). *Tenacibaculum discolor* sp. nov. and *Tenacibaculum gallaicum* sp. nov., isolated from sole (*Solea senegalensis*) and turbot (*Psetta maxima*) culture systems. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58:21-25.

Roberts RJ (2001). Fish pathology. Third edition, W.B. Saunders, Edinburgh, UK.

Santos Y, Romalde JL, Bandín I, Magariños B, Núñez S, Barja JL, Toranzo AE (1993). Usefulness of the API-20E system for the identification of bacterial fish pathogens. *Aquaculture* 116:111-120.

Santos Y, Pazos F, Bandín I, Toranzo AE (1995). Analysis of antigens present in the extracellular products and cell surface of *Vibrio anguillarum* serotypes O1, O2, and O3. *Applied and Environmental Microbiology* 61:2493-2498.

Shephard KL (1994). Functions for fish mucus. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 4:401-429.

van Gelderen R, Carson J, Nowak B (2009). Effect of extracellular products of *Tenacibaculum maritimum* in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* 32:727-731.

van Gelderen R, Carson J, Nowak B (2011). Experimentally induced marine flexibacteriosis in Atlantic salmon smolts *Salmo salar*. II. Pathology. *Diseases of Aquatic Organisms* 95:125-135.

Wiklund T, Bylund G (1993). Skin ulcer disease of flounder *Platichthys liesus* in the northern Baltic Sea. *Diseases of Aquatic Organisms* 17:165-174.

**CAPÍTULO 6.**  
**IMMUNOHISTOCHEMICAL DIAGNOSIS OF**  
**TENACIBACULOSIS IN PARAFFIN EMBEDDED**  
**TISSUES OF SENEGALESE SOLE (*Solea senegalensis*)**



## **6.1. INTRODUCTION**

Tenacibaculosis is a very important disease that affects a large number of species worldwide causing heavy losses for the aquaculture industry (Santos et al. 1999, Toranzo et al. 2005). The disease has also been reported in farmed Senegalese sole (Cepeda and Santos 2002, Vilar et al. 2012) causing severe ulcerative skin lesions, significant economic losses and blocking up the development of this new production species. The main causal agent is *Tenacibaculum maritimum*, a Gram-negative bacterium, usually with filamentous morphology in external lesions (Avendaño-Herrera et al. 2006a, Santos et al. 1999, Toranzo et al. 2005), but that tend to become spherical in internal organs (Bernardet 1998).

Nowadays, the presumptive diagnosis of tenacibaculosis is based on the gross lesions of affected fish and in the presence of abundant long, thin, rod-shaped bacteria in wet mounts or Gram preparations (Avendaño-Herrera et al. 2006b, Santos et al. 1999, Toranzo et al. 2005). However, the gross lesions can be very variable according to the fish species affected (Chen et al. 1995). In early lesions, *T. maritimum* is not visible in wet mounts (Toranzo et al. 2005), hindering the early diagnosis of this disease. In addition, this bacterium is a ubiquitous and opportunistic pathogen (Avendaño-Herrera et al. 2006b), able to withstand the bactericidal action of the skin mucus (Magariños et al. 1995, Pazos 1997), which may act as a reservoir and source of nutrients for the bacteria. For this reason, the bacteria can be detected in the skin of fish (Avendaño-Herrera 2005), even if no evident lesions are present (Piñeiro-Vidal 2008).

Currently, the confirmatory diagnosis of tenacibaculosis is carried out by agar cultivation, identification of the microorganisms based on their phenotypical characteristics and complemented by the use of serological and molecular methods (Santos et al. 1999, Cepeda and Santos 2002, Toranzo et al. 2005). However, these methods are hampered by the need for a previous isolation of the pathogen and lack sufficient sensitivity to allow the detection of low levels of *T. maritimum*. Therefore, the development of reliable methods for the detection and identification of this pathogenic organism in diseased and carrier fish is crucial for the establishment of effective control measures, in order to eliminate or reduce the impact of the disease in farmed fish.

Furthermore, the development of effective vaccines and vaccination strategies requires a clear knowledge of the pathogenesis and the route of infection of the tenacibaculosis. However, factors determining the virulence of this pathogen have not yet been elucidated. Moreover, few attempts have been made to clarify the route of entry of the bacteria, their distribution within the fish tissues and the evolution of the pathological process (Avendaño-Herrera et al. 2006b, Vilar et al. 2012).

Immunohistochemistry (IHC) offers simple, rapid, sensitive and easily automated methods to confirm disease diagnosis and to detect antigen and/or pathogens within the injured tissues that cannot be identified by traditional microbiological or by molecular techniques (Evensen et al. 1991, Adams and Marin de Mateo 1994, Adams et al. 1995, Coll and Dominguez-Juncal 1995, Adams 1999, Sheng et al. 2003, Adams 2004, Santos 2005, Dagleish et al. 2010). IHC have already proved to be

useful for diagnosis of important diseases in aquaculture (Maniatis et al. 2000, OIE 2006, Hagiwara et al. 2009, Nilsen et al. 2011).

The purposes of this paper were to 1) develop a specific immunohistochemical assay for detection of *T. maritimum* in paraffin embedded tissues, and 2) study of tissular and cellular distribution of *T. maritimum* antigen in *Solea senegalensis* collected during outbreaks of the disease, in order to gain insight into the pathogenesis of the tenacibaculosis.

## **6.2. MATERIALS AND METHODS**

### **6.2.1. Experimental infection**

#### *6.2.1.1. Bacteria*

*T. maritimum* LL01.8.3.8 isolated from a natural outbreak of tenacibaculosis in Senegalese sole and recently passaged through Senegalese sole was used for experimental infection. Stock cultures of the strains were stored at -70°C in Microbank™ tubes (Prolab Diagnostics, Ontario, Canada) until passage on *Flexibacter maritimus* Medium (FMM) agar (Pazos et al. 1996) immediately before use. Bacterial cultures were incubated at 25°C for 48-72 h.

#### *6.2.1.2. Source of antibody*

Polyclonal antiserum was produced in rabbit against formalin-killed

*T. maritimum* strain LL01.8.3.8 (adjusted to  $1 \times 10^9$  cells/ml, McFarland standard n° 3) as previously described (Santos et al. 1995). Anaesthetized rabbits were bled by ear artery puncture and serum recovered was distributed undiluted and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. Pre-immune serum was previously collected from the rabbit. The immunoglobulin G fraction (IgG) from antiserum was purified through a pre-packed protein A sepharose affinity chromatography column (HiTrap™ Protein A HP, GE Healthcare) according to the manufacture's protocol. Protein concentration of purified antibodies was determined by the method of Bradford (1976) using the commercial kit available from Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories). Purified antibodies were stored and kept at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

The serum was cross absorbed as previously described (Santos et al. 1995) by using whole cell pellets of *Tenacibaculum discolor* NCIMB 14278<sup>T</sup>, *Tenacibaculum gallaicum* NCIMB 14147<sup>T</sup> and *Tenacibaculum soleae* NCIMB 14368<sup>T</sup>.

#### *6.2.1.3. Challenge procedure*

Juvenile Senegalese sole (average weights of  $11,47 \pm 2,16$  g) of certified disease free status were obtained from a farm of Galicia (Northwest of Spain). Fish were moved to the aquarium of the Faculty of Biology of the University of Santiago de Compostela (Spain) in a transportation tank containing aerated seawater. Fish were fed with a commercial diet and reared in a 500 l tanks, aerated and supplied with sand-filtered seawater at  $18^{\circ}\text{C}$  and 32‰ of salinity until the infection experiments started after the quarantine period.

For challenge, fifteen fish were injected subcutaneously in the dorsal medium sinus (LaPatra et al. 2010) with 0.1 ml of the bacterial suspension ( $10^8$  cfu/fish) of *T.maritimum* LL01.8.3.8 strain. Cell viability of bacterial suspension was verified by the plate dilution method using FMM plates and counting the bacterial colonies produced. Fish of control group (15 specimens) received 0.1 ml of sterile saline solution. During the experimental infections, all fish were kept in tanks (length 115 x width 96 x depth 65 cm) under the conditions of water quality and ventilation described above and fed *ad libitum* until the end of the assay. Samples from challenged fish and control groups were taken at 24, 48 and 72 h post inoculation (hpi).

*6.2.1.4. Samples for microbiological, PCR and histopathological studies.*

Fish were sacrificed by overexposure to Tricaine methane sulphonate (MS222) (Sigma-Aldrich, Germany) and complete necropsy was performed. Samples from kidney and/or spleen, and external lesions of skin, obtained from experimentally infected and control fish, were streaked on the surface of plates containing Marine Agar (MA; Cultimed, Panreac Química Sau, Barcelona, Spain) and FMM (Pazos et al. 1996) and incubated at 25°C for 24-72 h for bacteriological analysis. Pure cultures of the isolates obtained on MA and FMM agar plates were identified using morphological, physiological and biochemical tests and API ZYM (bioMérieux) as previously described (Santos et al. 1993, Bernardet et al. 2002) and PCR (Cepeda et al. 2003).

For histopathological study, samples of skin lesions and underlying muscle, spleen, kidney, intestine and heart from experimentally inoculated and control fish were fixed in Bouin's solution for 18-24 h, embedded in paraffin wax, sectioned at 3  $\mu\text{m}$  in thickness, mounted on slides and stained with hematoxylin-eosin (H-E).

### **6.2.2. Natural outbreaks**

A retrospective study of 33 Senegalese sole, showing different degrees of erosive and ulcerative skin lesions was performed. Fish were collected from December 2003 to August of 2005 in a farm located in Galicia (Northwest of Spain). These individuals came from stocks suffering tenacibaculosis, previously confirmed by histological, microbiological and molecular procedures (Table 1). A total of 128 field samples from skin and underlying muscle, spleen, kidney, intestine and heart fixed in 10% neutral buffered formalin and Bouin's solution, were employed for IHC assay to test the usefulness of the developed IHC technique for the diagnosis of tenacibaculosis.

### **6.2.3. Immunohistochemistry**

Sections of the paraffin embedded tissues were placed on silane coated slides, allowed to dry overnight, and then dewaxed and hydrated. Slides were incubated for 30 min in Peroxidase Blocking Reagent (Dako, Denmark) to quench endogenous peroxidase activity or for 24 h to bleach melanin. Sections untreated or treated by heating (pressure cooker for 12 min in 10 mM sodium citrate buffer, pH 6.0) to enhance their antigenicity (Bermúdez et al. 2006), were washed and incubated

with the affinity purified rabbit anti-*T. maritimum* LL01.8.3.8 antibody (anti-Tm). After washing, sections were incubated for 30 min with an anti-rabbit EnVision+ System Labelled Polymer-HRP (Dako). After rinsing, the sections were finally developed using diaminobenzidine as chromogen (Dako), washed in water, counterstained with hematoxylin, dehydrated and mounted. Optimal dilution of primary antibody (concentrations of 10 to 0.01 µg/ml) and incubation times (30, 60, 90 and 120 min) were determined with appropriate positive (tissues of fish experimentally infected with *T. maritimum* LL01.8.3.8) and negative controls (tissues from fish injected with sterile saline solution).

In order to test the specificity of the assay, we used samples of skin and/or internal organs from Senegalese sole experimentally infected with *T. soleae*, *T. gallaicum* and *T. discolor*. Besides, samples stored in our laboratory from turbot experimentally infected with other non-related pathogens (*Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida*, *Listonella anguillarum*) were tested.

Controls were carried out omitting the primary antibody or by replacing the primary or the secondary antibody by PBS, pre-immune rabbit serum or an irrelevant polyclonal antibody in the same dilution.

Working conditions were chosen to obtain maximum reactivity in the positive samples and no reactivity in the negative specimens. Fish samples were considered positive for tenacibaculosis by IHC only if the bacterial antigen was marked within the tissue lesions.

| Sampling              | Fish analyzed | Severity of cutaneous lesions | Bacteria recovery | PCR positive | Immunohistochemistry |           |          |          |          |
|-----------------------|---------------|-------------------------------|-------------------|--------------|----------------------|-----------|----------|----------|----------|
|                       |               |                               |                   |              | Skin                 | Intestine | Spleen   | Kidney   | Heart    |
| <b>1</b>              | 4             | 2                             | 4/4               | 2/2          | + (2/2)              | + (3/3)   | - (0/3)  | - (0/3)  | + (1/3)  |
| <b>2</b>              | 11            | 1                             | 3/6               | 3/4          | + (9/10)             | + (8/9)   | + (5/11) | + (5/11) | + (7/11) |
| <b>3</b>              | 4             | 1                             | 0/4               | ND           | + (2/4)              | + (1/3)   | - (0/3)  | - (0/1)  | - (0/1)  |
| <b>4</b>              | 8             | 3                             | 8/8               | 8/8          | + (7/7)              | + (7/7)   | + (4/5)  | + (5/6)  | + (2/3)  |
| <b>5</b>              | 6             | 2                             | 6/6               | 6/6          | + (5/6)              | + (1/5)   | + (2/5)  | + (2/6)  | ND       |
| <b>Total positive</b> |               |                               | 21/28             | 19/20        | 25/29                | 20/27     | 11/27    | 12/27    | 10/18    |
|                       |               |                               | 75%               | 95%          | 86%                  | 74%       | 41%      | 44%      | 56%      |

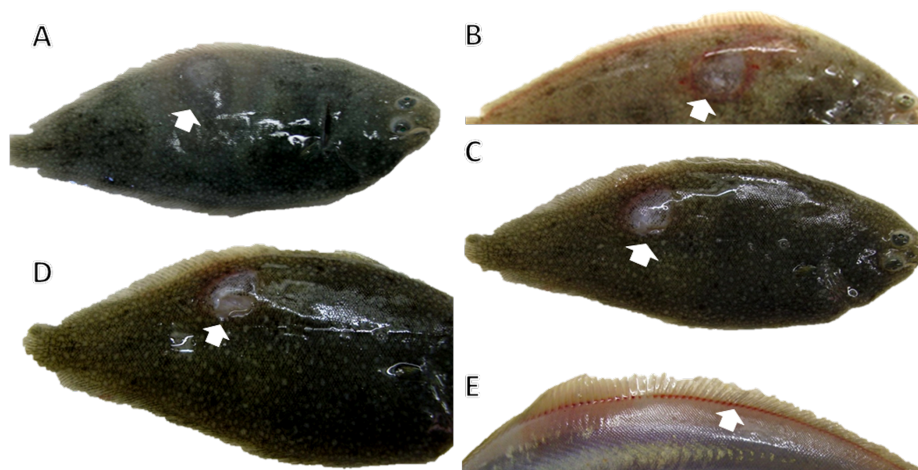
**Table 1.** Results obtained after the analysis of Senegalese sole from a tenacibaculosis outbreak by using conventional microbiological and PCR identification methods and immunohistochemistry assay. Severity of cutaneous lesions, 1, slight swelling in the skin; 2, erosive lesions; 3, deep ulcers. Immunohistochemistry, (+), positive reaction with antibody anti-Tm; (-), negative reaction with antibody anti-Tm; (ND), not determined.

## 6.3. RESULTS

### 6.3.1. Experimental infection

#### 6.3.1.1. Macroscopic, microbiological and histopathological findings

Early signs of the infection were observed at 24 hpi and consisted of localized swelling of the skin near to the injection point (Figure 1 A). This was followed by areas of eroded and necrotized epidermis with hyperaemic halo and loss of scales at 48 hpi (Figures 1 B and 1 C). In the last sampling, severe ulcerative lesions were observed, leaving the affected muscle packets exposed to the environment (Figure 1 D). In addition, hyperaemia in the base of dorsal fin and petecchiae in the interradiar tissue of the fins were detected (Figure 1 E).

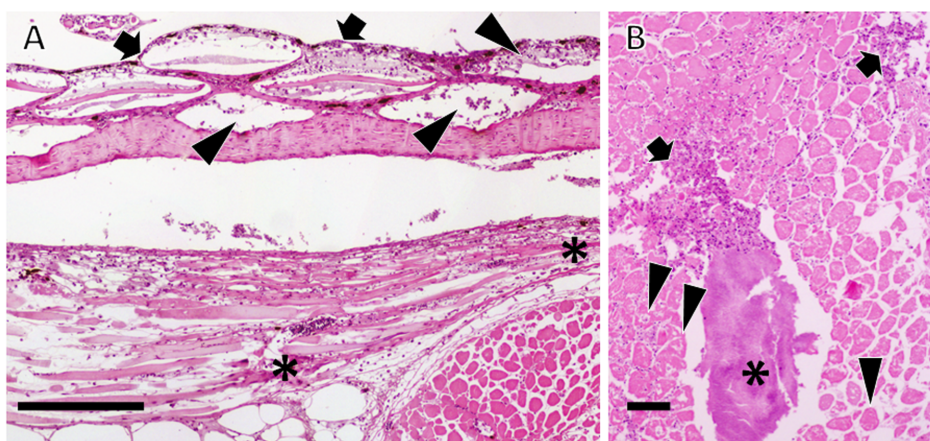


---

**Figure. 1.** Main macroscopic lesions displayed by Senegalese sole experimentally infected with *T. maritimum*. **A.** Swelling of the skin near the injection point at 24 hpi (arrow). **B and C.** Eroded/necrotized skin with hyperaemic halo and loss of scales near the injection point at 48 hpi (arrows). **D.** Deep ulcerative lesion where the muscle can be observed at 7 dpi (arrow). **E.** Hyperaemia in the base of dorsal fin and petecchiae in the interradiar tissue at 48 hpi (arrow).

---

At histopathological level, in the point of inoculation, loss of epidermis with detachment of scales, swelling of scale pockets filled with oedematous liquid and inflammatory cells were observed (Figure 2 A). Moreover, necrosis extended through the connective tissue of the hypodermis affecting the most superficial muscle layers and a mild inflammatory response associated could be seen (Figures 2 A and 2 B). In the internal organs analyzed no pathological changes were observed.



**Figure 2.** **A.** Sample of skin close to the ulcer with loss of the epidermis (arrows), scale pockets dilated, some without scales and showing inflammation and oedema (arrowheads). Necrosis in hypodermis and superficial muscles with inflammatory cells (asterisks). H-E. Bar 500  $\mu\text{m}$ . **B.** Necrosis in the point of inoculation (asterisk) and degeneration of muscles fibres (arrowheads). Inflammatory response associated (arrows). H-E. Bar 150  $\mu\text{m}$ .

---

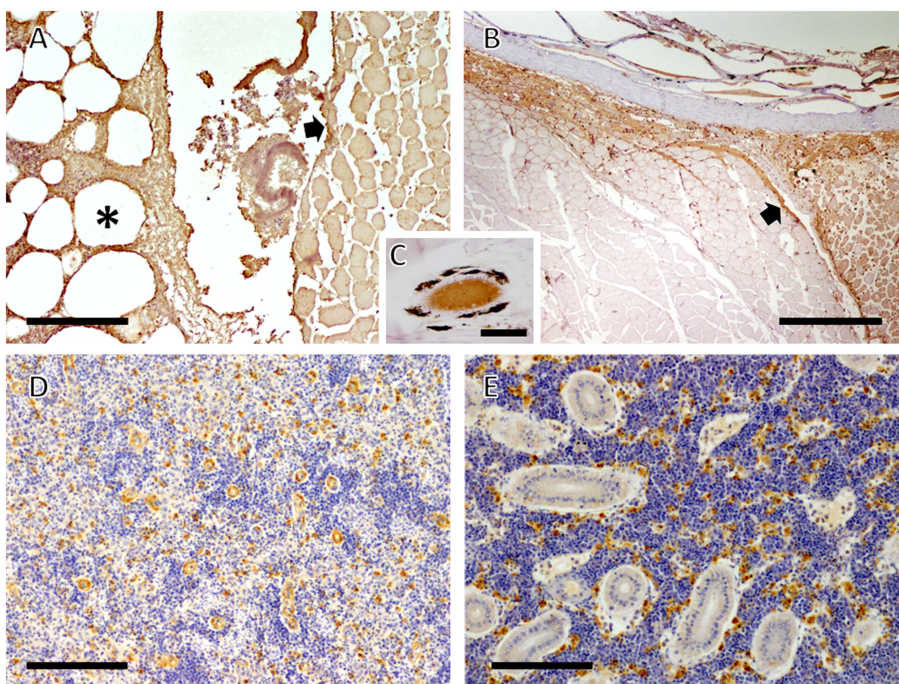
### 6.3.1.2. Immunohistochemistry

Tissue sections (skin and underlying muscle, spleen and kidney) from fish experimentally infected with *T. maritimum* strain LL01.8.3.8 were used to select optimal dilution and period of incubation for the primary antibody. Optimal staining was obtained when sections were incubated for 1 h with anti-Tm antiserum at a concentration of 0,02  $\mu\text{g/ml}$

followed by treatment for 30 min with the anti-rabbit EnVision+ System Labelled Polymer-HRP (Dako).

IHC analysis of areas with ulcers showed an intense staining in the hypodermis and muscle at the inoculation point (Figure 3 A). There was an evident immunoreactivity from the hypodermis to the connective tissue surrounding the muscle (Figure 3 B). Moreover, a strong immunostaining of the plasma could be detected into the blood vessels of the hypodermis in these areas (Figure 3 C). The analysis of spleen and kidney displayed intense staining into macrophages located inside the blood vessels but microscopical lesions were not detected in these organs (Figures 3 D and 3 E).

The results demonstrated that the developed IHC technique detected all the fish-pathogenic *Tenacibaculum* species analyzed (*T. maritimum*, *T. soleae*, *T. discolor* and *T. gallaicum*) at the genus level. However, differentiation of *T. maritimum* from the other *Tenacibaculum* species was achieved by using the antibody anti-Tm after cross-adsorption with *T. discolor*, *T. gallaicum* and *T. soleae* whole cells. No cross-reaction was observed when sections of turbot tissues infected with *L. anguillarum*, *A. salmonicida* and *E. scophthalmi* were examined. No reaction was observed in tissue from negative control sections or fish from control group of the experiment.



---

**Figure 3.** IHC from Senegalese sole experimentally infected with the strain LL01.8.3.8 of *T. maritimum* **A.** Intense staining with the antibody anti-Tm in the point of inoculation in the hypodermis (asterisk) and muscles (arrow). Bar 200  $\mu\text{m}$ . **B.** Strong positive reaction in the hypodermis towards connective tissue surrounded muscle (arrow). Bar 500  $\mu\text{m}$ . **C.** Vessel located in the hypodermis of infected fish showed strong immunostaining in the plasma. Bar 50  $\mu\text{m}$ . **D.** Spleen with immunoreactive macrophages randomly distributed between interstitial tissue and surrounded the vessels. Bar 100  $\mu\text{m}$ . **E.** Kidney with evident immunostaining in macrophages located in the peritubular capillaries. Bar 100  $\mu\text{m}$ .

---

### 6.3.2. Natural outbreak

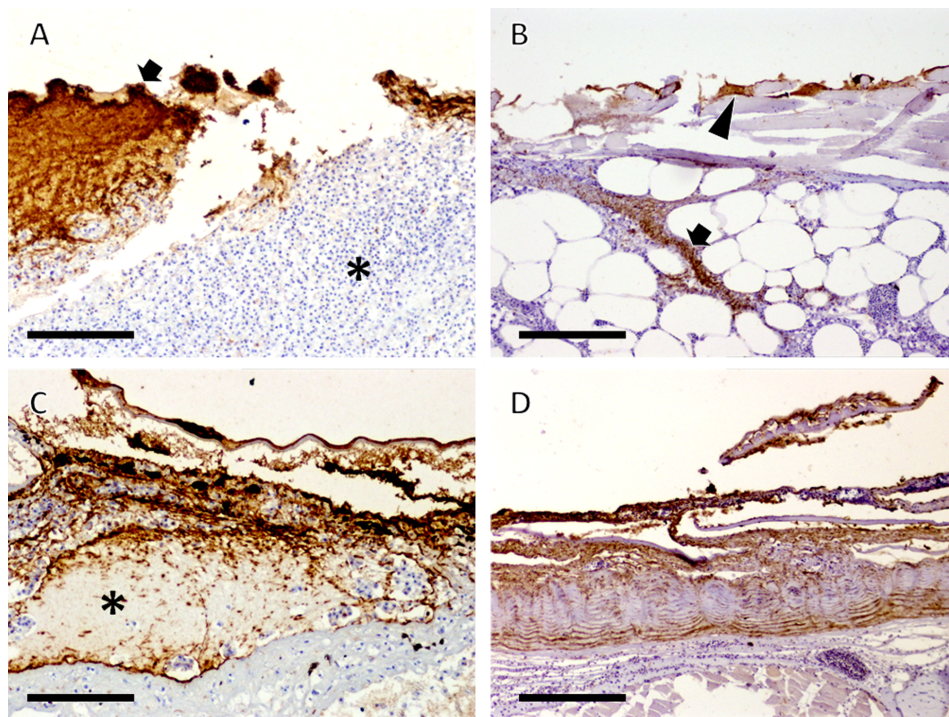
The optimized IHC technique formerly described was used to analyse samples from naturally infected fish, which had been confirmed to suffer from tenacibaculosis by histological, microbiological and molecular methods (Table 1). The macroscopic and histopathological lesions observed in tissue samples from fish recovered during

tenacibaculosis outbreaks were similar to those described in fish experimentally infected. Briefly, macroscopic deep ulcers reaching the muscle in different localizations in the body of the fish were seen. Moreover, in some cases hyperaemia in the base of fins and petechiae in the interradiar tissue of the fins were observed. Histopathology demonstrated loss of epidermis, dermis and hypodermis, leaving the muscle exposed. Extensive necrosis was detected in the hypodermis and superficial muscle bundles. Occasionally, petechiae and microthrombus were seen in the vessels of the kidney suggesting disseminated intravascular coagulation.

The analysis by IHC of samples of the skin from areas with lesions showed a strong positive reaction in the epidermis and dermis along with a severe inflammatory response in the hypodermis (Figure 4 A).

Immunoreactivity was also observed between adipocytes in the hypodermis and in the connective tissue surrounding muscular packets in areas with extensive damage (Figure 4 B). Strong immunopositivity was obtained inside the scale pockets, close to skin ulcers (Figure 4 C). Occasionally in cutaneous areas with erosive lesion, *T. maritimum* antigen was identified located over the epithelial cells of epidermis and in the dermis (Figure 4 D).

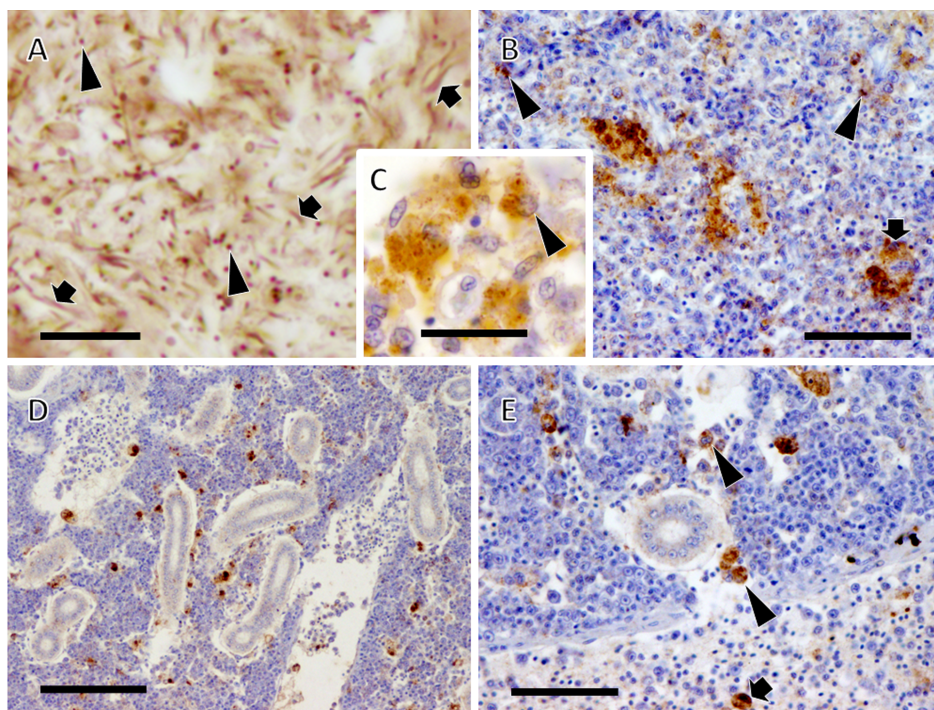
In ulcers, the immunoreactive bacteria were detected free in damaged tissues showing different morphologies, from a large and filamentous appearance to a small spherical form (Figure 5 A). In the spleen of affected fish the bacterial antigen was mostly distributed within ellipsoidal macrophages but also free in the white pulp (Figures 5 B and 5 C).



---

**Figure 4.** Photomicrographs of IHC against *T. maritimum* antigen from natural infected Senegalese sole by *T. maritimum*. **A.** Strong positive reaction in the dermis (arrow). Severe inflammatory reaction located in the hypodermis (asterisk). Bar 100  $\mu\text{m}$ . **B.** Immunoreactivity between adipocytes in the hypodermis and in the connective tissue surrounding muscular packets in areas with extensive damage (arrowhead). Mild to moderate inflammatory response in positive areas (arrow). Bar 200  $\mu\text{m}$ . **C.** Positive immunostaining against bacterial antigen inside the scale pockets (asterisk). Bar 100  $\mu\text{m}$ . **D.** Skin showed mild lesions close to the ulcer with evident immunostaining in epidermis and dermis. Bar 200  $\mu\text{m}$ .

---



---

**Figure 5.** Photomicrographs of IHC against *T. maritimum* antigen from natural infected Senegalese sole by *T. maritimum*. **A.** Bacterial antigen in skin samples showed different morphologies from filamentous (arrows) to spherical shapes (arrowheads). Bar 10  $\mu\text{m}$ . **B.** Positivity around ellipsoids in the spleen (arrow) and free in the parenchyma (arrowheads). Bar 50  $\mu\text{m}$ . **C.** Ellipsoidal macrophages showing strong positivity in the cytoplasm (arrowhead). Bar 20  $\mu\text{m}$ . **D.** Immunoreactivity inside the macrophages associated with the peritubular capillaries in the kidney. Bar 100  $\mu\text{m}$ . **E.** Macrophages inside vessels with evident immunoreactive reaction in the cytoplasm (arrow) and into the peritubular capillaries (arrowheads). Bar 50  $\mu\text{m}$ .

---

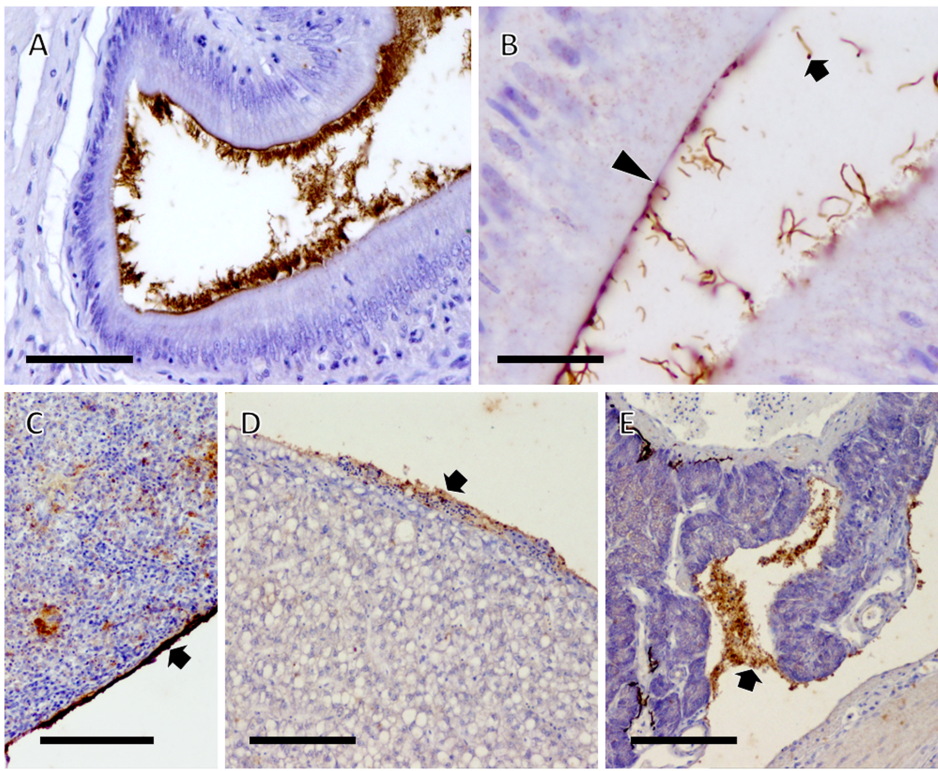
In the kidney, positive immunoreaction was mainly distributed inside the macrophages associated with the peritubular capillaries and occasionally between the renal interstitial tissues (Figure 5 D). Finally, macrophages with evident immunoreactive reaction in the cytoplasm could be seen located into the vessels and into the peritubular capillaries (Figure 5 E).

Strikingly, in the intestinal tract a large amount of immunoreactive bacteria in close contact with the surface of the lining epithelium was observed (Figures 6 A and 6 B). Occasionally, free bacteria appeared in the intestinal lumen although no pathological changes were detected at this level. Bacteria showed evident filamentous morphology and sometimes in one of the ends of the bacteria a spherical head could be seen (Figure 6 B).

In some of the fish analyzed, the serosa of spleen, liver and pancreas showed a strong positive immunostaining with a lineal distribution (Figure 6 C) and with a mild inflammatory response associated (Figures 6 D and 6 E).

In summary, the majority of skin (86%) an intestine (74%) samples from the fish analyzed gave positive results using the antibody anti-Tm. Regardless of the severity of cutaneous lesions, positive immunostaining was detected in 11 of 27 samples of spleen (41%), in 12 of 27 of kidney (44%) and in 10 of 18 of heart (56%) (Table 1).

In the 75% of samples taken for bacteriology, bacterial growth was obtained and when the bacterium was recovered, *T. maritimum* was identified by PCR in 19 of 20 samples analyzed (95%). Table 1 summarized the percentage of detection of the bacteria by means of bacteria recovery, PCR analysis and IHC.



---

**Figure 6.** Photomicrographs of IHC against *T. maritimum* antigen from fish of outbreak. **A.** Immunopositive bacterial antigen located in the surface of the intestinal epithelium. Bar 50  $\mu\text{m}$ . **B.** Filamentous bacteria displayed a strong immunostaining attached to the mucosa (arrowhead) or free in the lumen. Some of the bacterial forms showed a spherical head at one end (arrow). Bar 20  $\mu\text{m}$ . **C.** Serosa of the spleen showed the presence of bacterial antigen (arrow). Bar 100  $\mu\text{m}$ . **D and E.** Serosa of the liver and pancreas showed the presence of bacterial antigen with a mild inflammatory response associated (arrow). Bar 100  $\mu\text{m}$ .

---

#### 6.4. DISCUSSION

In our study an IHC assay was optimized to identify *T. maritimum* antigens using paraffin embedded tissue specimens from Senegalese sole experimentally infected with the bacterium. The usefulness of the developed IHC technique for the detection of *T. maritimum* in tissues

from fish collected during several outbreaks of tenacibaculosis affecting Senegalese sole farms of Galicia is reported.

Traditionally, diagnosis of bacterial diseases was based on culture methods followed by the use of PCR or serological methods to confirm the results. However, these methods did not allow distinguish colonization from tissue invasion. During the last decade there has been an increasing interest in the use of specific antibodies in the detection and identification of the causative agents in many infectious diseases. IHC is especially useful when microorganisms are difficult to identify by routine or special stains, are fastidious to grow, or exhibit an atypical morphology (Eyzaguirre and Haque 2008, Ramos-Vara et al. 2008). Moreover, IHC allows co-localization of an antigen and a lesion, increasing diagnostic accuracy and understanding of pathogenesis (Ramos-Vara et al. 2008, Dagleish et al. 2010).

The IHC technique developed in the present work was specific and sensitive, and allowed the detection of the fish-pathogenic *Tenacibaculum* species analyzed (*T. maritimum*, *T. soleae*, *T. discolor* and *T. gallaicum*) at the genus level. Differentiation of *T. maritimum* from the other *Tenacibaculum* species was easily achieved by using serum cross-adsorbed with *T. discolor*, *T. gallaicum* and *T. soleae* whole cells. No cross-reaction was observed when sections of fish tissues infected with other fish pathogenic bacteria and parasites were examined. All these findings make this IHC procedure very valuable as a diagnostic option for tenacibaculosis diseases.

The exact portal of entry of *T. maritimum* into the host tissue remains unknown (Avendaño-Herrera et al. 2006b), but previous data have suggested that skin is a target organ and it is a possible portal of infection (Magariños et al. 1995). In accordance with this, in the natural outbreaks investigated in our study, immunoreactivity against *T. maritimum* antigen was mainly observed in damaged skin, as well as necrosis and inflammation. The fact that lesions were mostly observed in the skin, together with the distribution of bacterial antigen to the underlying tissues in naturally infected fish, may indicate the cutaneous entry. However, there are reports that support the hypothesis that another factors, such as the skin surface condition, may influence in the establishment of the disease (Chen et al. 1995, Constenla et al. 2011, Vilar et al. 2012).

It have been suggested that *T. maritimum* is able to spread to the internal organs and cause a septicemia (Bernardet 1998). In the present study, *T. maritimum* antigen was observed in the lesions of the skin, in spleen, kidney, in the serosa of spleen, liver and pancreas and in the blood vessels. Moreover, the localization of this antigen was closely associated with the detection and identification of this bacterium in the spleen, kidney and lesions of skin using microbiological and/or molecular methods. For these reason, it is suggested that once the bacteria penetrate the skin, reach the bloodstream (Ferguson 2006, Hagiwara et al. 2009, Bjelland et al. 2012) and cause a systemic infection in the animal.

Furthermore, the different morphologies of *T. maritimum* described in the current experiment could be explained because this bacterium has

the ability of become spherical. This change in the bacterial morphology was also reported by several authors in old cultures (see reviews of Santos et al. 1999 and Toranzo et al. 2005).

To date, only the mucus covering the fish surface has been proposed as a reservoir for *T. maritimum* (Magariños et al. 1995, Avendaño-Herrera et al. 2005). However, in our study, *T. maritimum* antigens were detected in the intact gastrointestinal lumen (74% of the samples tested) from the fish affected of tenacibaculosis. This seems to point to the intestine as a reservoir for the bacteria, and therefore, giving it an important secondary role in the pathogenesis of the disease. This assumption is in agreement with recent studies in Atlantic salmon challenged with *Vibrio salmonicida* (Bjelland et al. 2012).

In summary, in our study, a diagnostic tool that allows detecting specifically *T. maritimum* in paraffin-embedded samples has been developed. In addition, the skin has been corroborated as route of entry of the bacterium and the distribution of *T. maritimum* antigen in internal organs showed the capacity of the bacterium to provoke septicaemia. Finally, the presence of *T. maritimum* in the intestine strongly suggests that this epithelium may act as a possible reservoir of the bacterium.

## **6.5. REFERENCES**

Adams A, Marin de Mateo M (1994). Immunohistochemical detection of fish pathogens. In: Techniques in Fish Immunology. Ed: Stolen JS, Fletcher TC, Kaattari SL, Rowley AF. SOS Publications, pp 133-144.

Adams A, Thompson KD, Morris D, Farias C, Chu Chen S (1995). Development and use of monoclonal antibody probes for immunohistochemistry, ELISA and IFAT to detect bacterial and parasitic fish pathogens. *Fish and Shellfish Immunology* 5:537-547.

Adams A (1999). Application of antibody probes in the diagnosis and control of fish diseases. In: *Aquaculture and Biotechnology*. Ed: Karunasagar I, Karunasagar I, Reilly A. Oxford and IHB Publishing Co. PVT. LTD, pp. 1-12.

Adams A (2004). Immunodiagnostics in aquaculture. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 24:33-37.

Avendaño-Herrera RE (2005). Avances en el conocimiento del patógeno de peces *Tenacibaculum maritimum*, implicaciones en el diagnóstico y prevención de la enfermedad. Tesis Doctoral. Santiago of Compostela. Universidad de Santiago de Compostela.

Avendaño-Herrera R, Toranzo AE, Romalde JL, Lemos ML, Magariños B (2005). Iron uptake mechanisms in the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum*. *Applied and Environmental Microbiology* 71:6947-6953.

Avendaño-Herrera R, Irgang R, Magariños B, Romalde JL, Toranzo AE (2006a). Use of microcosms to determine the survival of the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum* in seawater. *Environmental Microbiology* 8:921-928.

Avendaño-Herrera R, Toranzo AE, Magariños B (2006b). Tenacibaculosis infection in marine fish caused by *Tenacibaculum maritimum*: a review. *Diseases of Aquatic Organisms* 71:255-266.

Bermúdez R, Vigliano F, Marcaccini A, Sitjà-Bobadilla A, Quiroga MI, Nieto JM (2006). Response of Ig-positive cells to *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) experimental infection in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.): A histopathological and immunohistochemical study. *Fish and Shellfish Immunology* 21:501-512.

Bernardet JF (1998). *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Flexibacter* and *Chryseobacterium* infections in cultured marine fish. *Fish Pathology* 33:229-238.

Bernardet JF, Nakagawa Y, Holmes B (2002). Proposed minimal standards for describing new taxa of the family *Flavobacteriaceae* and emended description of the family. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52:1049-1070.

Bjelland AM, Johansen R, Brudal E, Hansen H, Winther-Larsen HC, Sorum H (2012). *Vibrio salmonicida* pathogenesis analyzed by experimental challenge of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Microbial Pathogenesis* 52:77-84.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.

Cepeda C, Santos Y (2002). First isolation of *Flexibacter maritimus* from farmed Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) in Spain. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 22:388-392.

Cepeda C, García-Márquez S, Santos Y (2003). Detection of *Flexibacter maritimus* in fish tissues using nested PCR amplification. *Journal of Fish Diseases* 26:65-70.

Chen ME, Henry-Ford D, Groff JM (1995). Isolation and characterization of *Flexibacter maritimus* from marine fishes of California. *Journal of Aquatic Animal Health* 7:318-326.

Coll JM, Dominguez-Juncal J (1995). Applications of monoclonal antibodies in aquaculture. *Biotechnology Advances* 13:45-73.

Constenla M, Reig L, Padrós F (2011). The caudal fin as a potential achilles' heel for the Senegalese sole, *Solea senegalensis*. *Proceedings of 15<sup>th</sup> EAFP international conference on diseases of fish and shellfish, Split, Croatia*, p. 405 Abstract.

Dagleish MP, Benavides J, Chianini F (2010). Immunohistochemical diagnosis of infectious diseases of sheep. *Small Ruminant Research* 92:19-35.

Eyzaguirre E, Haque AK (2008). Application of immunohistochemistry to infection. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 132:424-431.

Evensen O, Espelid S, Hastein T (1991). Immunohistochemical identification of *Vibrio salmonicida* in stored tissues of Atlantic salmon *Salmo salar* from the first known outbreak of cold-water vibriosis ('Hitra disease'). *Diseases of Aquatic Organisms* 10:185-189.

Ferguson HW (2006). Systemic pathology of fish. A text and atlas of normal tissues in teleost and their responses in disease. Ed: Ferguson HW, Second edition, Scotian Press, London, UK.

Hagiwara H, Takano R, Noguchi M, Narita M (2009). A study of the lesions induced in *Seriola dumerili* by intradermal or intraperitoneal injection of *Streptococcus dysgalactiae*. *Journal of Comparative Pathology* 140:25-30.

LaPatra SE, Plant KP, Alcorn S, Ostland V, Winton J (2010). An experimental vaccine against *Aeromonas hydrophila* can induce protection in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 33:143-151.

Magariños B, Pazos F, Santos Y, Romalde JL, Toranzo AE (1995). Response of *Pasteurella piscicida* and *Flexibacter maritimus* to skin mucus of marine fish. *Diseases of Aquatic Organisms* 21:103-108.

Maniatis K, Morris DJ, Adams A, Pearson M (2000). Detection of *Photobacterium damsela* subspecies *piscicida* in fixed tissue sections using immunohistochemistry and antigen retrieval immunohistochemistry. *Journal of Fish Diseases* 23:343-347.

Nilsen H, Johansen R, Colquhoun DJ, Kaada I, Bottolfsen K, Vagnes O, Olsen AB (2011). *Flavobacterium psychrophilum* associated with septicaemia and necrotic myositis in Atlantic salmon *Salmo salar*: a case report. *Diseases of Aquatic Organisms* 97:37-46.

OIE (2006). Manual of diagnostic test for aquatic animals. 5th Edition.

Pazos F, Santos Y, Macías AR, Núñez S, Toranzo AE (1996). Evaluation of media for the successful culture of *Flexibacter maritimus*. *Journal of Fish Diseases* 19:193-197.

Pazos F (1997). "Flexibacter maritimus": estudio fenotípico, inmunológico y molecular. Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain.

Piñeiro-Vidal M (2008). Descripción de tres nuevas especies del género *Tenacibaculum* causantes de tenacibaculosis, aspectos taxonómicos y patogenicidad. Universidade de Santiago de Compostela, Servizo de Publicacións e Intercambio Científico, Santiago de Compostela.

Ramos-Vara JA, Kiupel M, Baszler T, Bliven L, Brodersen B, Chelack B, Czub S, Del Piero F, Dial S, Ehrhart EJ, Graham T, Manning L, Paulsen D, Valli VE, West K (2008). Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 20:393-413.

Santos Y, Romalde JL, Bandín I, Magariños B, Núñez S, Barja JL, Toranzo AE (1993). Usefulness of the API-20E system for the identification of bacterial fish pathogens. *Aquaculture* 116:111-120.

Santos Y, Pazos F, Bandín I, Toranzo AE (1995). Analysis of antigens present in the extracellular products and cell surface of *Vibrio anguillarum* serotypes O1, O2, and O3. *Applied and Environmental Microbiology* 61:2493-2498.

Santos Y, Pazos F, Barja JL (1999). *Flexibacter maritimus*, causal agent of flexibacteriosis in marine fish. In: ICES identification leaflets for diseases and parasites of fish and shellfish. Ed: Oliver G. International Council for the Exploration of the Sea, Copenhagen, Denmark 55:1-6.

Santos Y (2005). Principales enfermedades bacterianas en la piscicultura Ibérica: diagnóstico y vacunación. In: Inmunología e inmunopatología en piscicultura. Ed: Chaves E, García A, Meseguer J. Kiosco J.M.C., Murcia.

Sheng HY, Wu XP, Zhang QY (2003). Applications of monoclonal antibody technology on virology of aquaculture. *Virologica Sinica* 18:187-190.

Toranzo AE, Magariños B, Romalde JL (2005). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* 246:37-61.

Vilar P, Faílde LD, Bermúdez R, Vigliano F, Rianza A, Silva R, Santos Y, Quiroga MI (2012). Morphopathological features of a severe ulcerative disease outbreak associated with *Tenacibaculum maritimum* in cultivated sole, *Solea senegalensis* (L.). *Journal of Fish Diseases* 35:437-445.



**CAPÍTULO 7.**  
**PATHOLOGY AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY IN**  
**TURBOT AFTER EXPERIMENTAL INFECTION**  
**WITH *Tenacibaculum maritimum***



## **7.1. INTRODUCTION**

Tenacibaculosis is an important bacterial disease that affects a large number of marine fish species, causing heavy losses for the aquaculture industry worldwide (Santos et al. 1999, Toranzo et al. 2005). Although this disease have a great impact in aquaculture, relatively little is known about its pathogenesis and routes of infection (Avendaño-Herrera et al. 2006a). External lesions of the disease are very different depending on affected fish species, for this reason the disease has been named in many ways according to the macroscopic lesions (Baxa et al. 1986, Wakabayashi et al. 1986, Bernardet et al. 1990, Alsina and Blanch 1993, Chen et al. 1995, Ostland et al. 1999, Santos et al. 1999, Toranzo et al. 2005).

It is known that fish are constantly exposed to waterborne pathogens. In order to cause infection pathogens need to gain access to the host and penetrate its primary barriers (Lovoll et al. 2009). It is generally accepted that the major routes of bacterial entry are through the mucosal surfaces of skin, gastrointestinal tract and gills (Smith et al. 1999, Ling et al. 2001, Ringø et al. 2004, Ringø et al. 2007, Vilar et al. 2012).

Animal experimentation is an essential tool for the study of infection diseases in order to clarify mechanisms of disease pathogenesis characterizing the role of bacterial and host factors, or testing novel drugs and vaccine candidates (Chiavolini et al. 2008).

With regard to tenacibaculosis, different models of infection have been attempted to reproduce the disease. Wakabayashi et al. (1984) and Baxa et al. (1987) demonstrated that bath challenge was not a reliable method of inducing the disease unless the skin was previously scarified or abraded (Bernardet et al. 1994). However, other authors have reproduced the disease in bath using prolonged immersion of fish (Avendaño-Herrera et al. 2006b) or high inoculum doses (van Gelderen et al. 2011). Other authors reported that intramuscular and intraperitoneal routes were not effective in reproducing tenacibaculosis in experimentally inoculated fish (Wakabayashi et al. 1984, Alsina and Blanch 1993, Pepin and Emery 1993, Avendaño-Herrera et al. 2006b).

The aim of this research was evaluate subcutaneous and intraperitoneal routes of entry of *Tenacibaculum maritimum* with the goal of gain insight into the pathogenesis of the disease to improve treatment and prophylactic strategies.

## **7.2. MATERIALS AND METHODS**

### **7.2.1. Fish**

One hundred fifty healthy turbot with an average weight of  $62,11 \pm 27,32$  g were employed. Fish were reared in 500 l tanks (length 115 x width 96 x depth 65 cm), with aerated and sand-filtered seawater (32‰ salinity) at 18°C and fed with a commercial diet until the infection experiments started after the quarantine period.

### **7.2.2. Experimental procedure**

For challenge, bacterial cultures of the strain LL01.8.3.8 (serotype O1), grown for 48-72 h in FMM agar plates, were harvested with saline solution, washed two times by centrifugation (10.000 x g for 10 min) and suspended in the same solution at a concentration of  $10^9$  cells/ml (Tube 3, MacFarland scale). Cell viability of bacterial suspension was verified by the plate dilution method using FMM plates and counting the bacterial colonies produced.

Thirty fish were challenged by subcutaneous (SC) injection in the dorsal medium sinus (LaPatra et al. 2010) with 0.1 ml of the bacterial suspension ( $10^8$  cfu/fish) of the strain LL01.8.3.8 of *T. maritimum*. For the intraperitoneal (IP) challenge, one group of 30 fish was inoculated with 0.1 ml of a high dose (HD) of the bacterial suspension ( $10^9$  cfu/fish) and 30 fish were inoculated with 0.1 ml of a low dose (LD) of the bacterial suspension ( $10^8$  cfu/fish). Thirty control fish received 0.1 ml of saline sterile solution.

Samples from challenged and control fish were taken at 3, 6, 24, 48, 72 h post inoculation (hpi) and 7 days post inoculation (dpi). Fish were sacrificed by overexposure to Tricaine methane sulphonate (MS222) (Sigma-Aldrich, Germany) before sampling.

### **7.2.3. Bacteriological isolation**

Samples from spleen and kidney obtained from experimentally infected and control fish were streaked on the surface of plates of Marine Agar (MA; Cultimed, Panreac Química Sau, Barcelona, Spain) and FMM (Pazos et al. 1996) and incubated at 25°C for 24-72 h for bacteriological analysis. Pure cultures of the isolates obtained in MA and FMM agar plates were identified using morphological, physiological and biochemical tests and API ZYM methods (bioMérieux) (Santos et al. 1993, Bernardet et al. 2002) as well as serological and PCR procedures as previously described (Cepeda et al. 2003).

### **7.2.4. Histological and immunohistochemistry studies**

Tissue samples from skin and underlying muscle, spleen, kidney, gastrointestinal tract, liver, gills and heart were fixed in Bouin's solution for 18-24 h and embedded in paraffin wax. Sections 2-3 µm in thickness were collected on silane coated slides, allowed to dry overnight, and then they were dewaxed and hydrated. The sections were stained with hematoxylin-eosin (H-E) and PAS or used to immunohistochemistry (IHC) technique.

For the IHC, all incubations were performed at room temperature in a humid chamber and all washing procedures consisted of three successive 5 min immersions in phosphate-buffered saline (PBS; 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 0.5 % (v/v) Tween 20, pH 7.4). Endogenous peroxidase activity was quenched by incubating in

Peroxidase Blocking Reagent (Dako, Denmark) for 30 min. The sections were then washed again and incubated with the affinity purified rabbit anti-*T. maritimum* LL01.8.3.8 antibody (anti-Tm) for 2 h, washed and incubated for 30 min with an anti-rabbit EnVision+ System Labelled Polymer-HRP (Dako). After rinsing, the sections were finally developed using diaminobenzidine (Dako) as chromogen, washed in water, counterstained with hematoxylin, dehydrated and mounted. Negative controls were carried out substituting the primary antibody or the secondary antibody for PBS or an irrelevant polyclonal antibody. All the immunostaining series were performed using an autostainer instrument (Autostainer Universal Staining System, Dako), in order to standardize the technique avoiding variations in times of incubation, development and counterstaining.

### **7.3. RESULTS**

#### **7.3.1. Bacterial isolation**

*T. maritimum* was isolated from the spleen and kidney of fish inoculated both by SC and IP injection. No bacteria were recovered or PCR detected from internal organs from fish of the control group.

#### **7.3.2. Clinical signs and gross lesions**

In both groups of fish inoculated with *T. maritimum* bacterial suspensions, anorexia and lethargy were observed from 3 hpi to the end of the experiment.

In the fish inoculated subcutaneously, the first gross lesions were detected at 24 hpi, consisting in slight depigmentation of the skin at the point of inoculation over the dorsal median sinus. The depigmentation progressed along the skin throughout over the entire dorsal median sinus at 48 hpi. The inoculation point was swollen and discrete skin ulceration was observed. At 72 hpi, in the inoculation point the lesions displayed a circular appearance with a slight hyperemic halo around (Figure 1 A). Finally, at 7 dpi, fish showed a moderate ulcerative dermatitis and hyperaemia in the area of inoculation with loss of the epidermis and dermis. Besides, some fish exhibited diffuse hyperaemia or haemorrhage in the base and tip of ventral and dorsal fins and in the interradial tissue of pectoral and caudal fins in the last samplings.

In fish inoculated intraperitoneally, no macroscopical lesions were observed along the experiment.



---

**Figure 1.** Turbot with a depigmented area over dorsal medium sinus and hyperaemia in the point of inoculation (arrow).

---

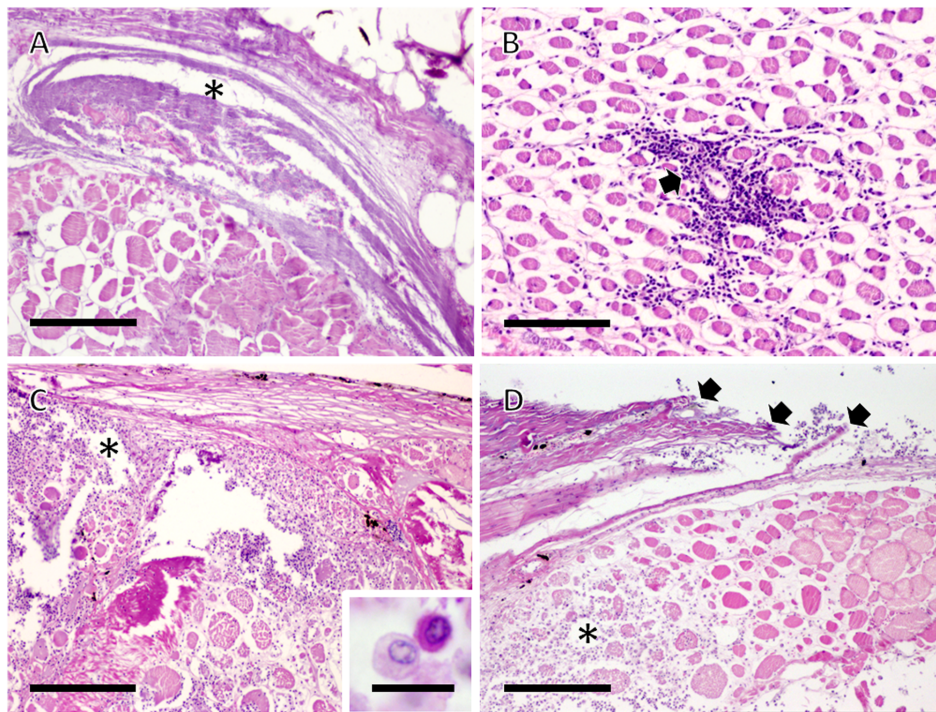
### **7.3.3. Histopathological examination and immunohistochemistry**

#### *7.3.3.1. SC experiment*

Fish inoculated subcutaneously showed different degrees of histological damage along the experiment. At 3 hpi, in the point of injection, clusters of bacteria among connective tissue of the hypodermis and muscular bundles could be seen. Fragments of degenerated muscular tissue were observed without inflammatory response associated (Figure 2 A).

At 6 hpi, an early inflammatory response consisted of granulocytes was seen around blood vessels as well as between the muscle bundles, spreading into the damaged area (Figure 2 B).

At 24, 48, 72 hpi and 7 dpi degeneration of muscle fibers showed different degrees of severity. Some fibers displayed shrinkage and separation of muscular epimysium, loss of striation, and finally areas of necrosis surrounded by inflammatory cells, mainly granulocytes and macrophages, that extended through the connective tissue of hypodermis reaching and affecting other muscular packets (Figures 2 C and 2 C inset). The epidermis and dermis were detached or absent, and scattered inflammatory cells extending to the ulcerated area were observed (Figure 2 D). In the samples of internal organs, no evidence of histopathological changes was present in any specimen along the experiment.



**Figure 2.** SC experiment. **A.** Clusters of bacteria located in the subcutaneous region in skin and superficial muscles (asterisk). H-E. Bar 200  $\mu\text{m}$ . **B.** Inflammatory cells around blood vessel (arrow). H-E. Bar 100  $\mu\text{m}$ . **C.** Extensive necrosis affecting muscular, hypodermis and dermis layers with an inflammatory response associated (asterisk). H-E. Bar 100  $\mu\text{m}$ . **Inset.** Inflammatory cells in the damaged areas. PAS. Bar 10  $\mu\text{m}$ . **D.** Ulcerative dermatitis with loss of epidermis and dermis (arrows) and necrosis in the muscular layer with inflammatory cells affecting superficial and deep muscles (asterisk). H-E. Bar 200  $\mu\text{m}$ .

---

Immunopositivity was mainly detected in skin and muscle fibres, spleen and kidney (Table 1).

In samples of skin and muscles, evolution of lesions was clearly defined. At 3 hpi, in the point of injection, a great amount of positive bacterial antigen was detected, affecting hypodermis and superficial muscular packages, but no inflammatory response was associated

(Figure 3 A). At 24 hpi, immunoreactivity into the cytoplasm of the granulocytes and macrophages was detected, mainly in the inoculation site and spreading through connective tissue of hypodermis (Figure 3 B) and muscles (Figure 3 C).

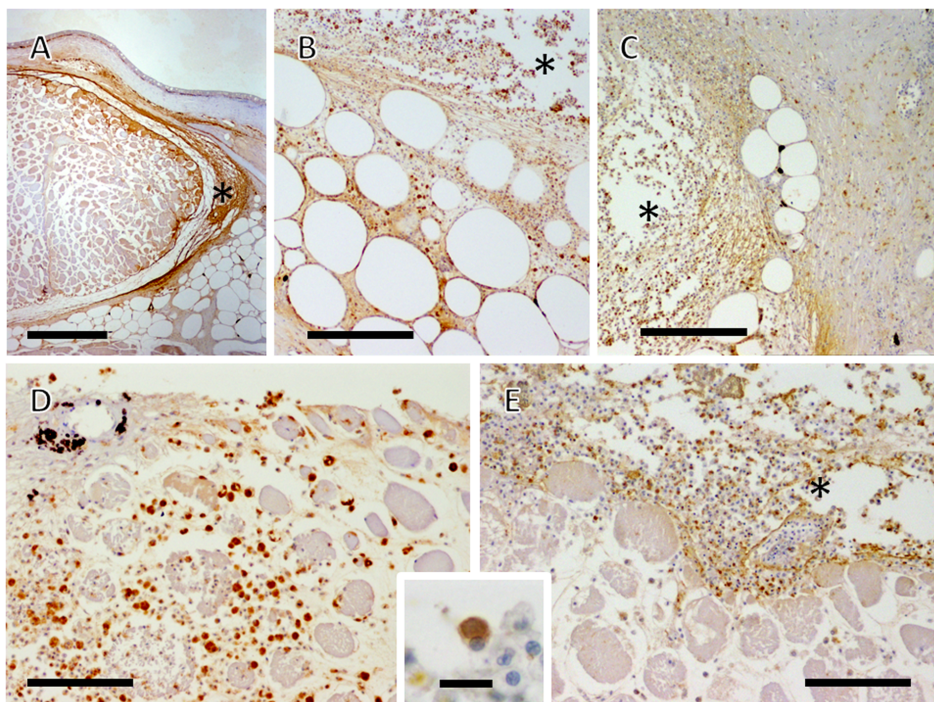
|        | Subcutaneously inoculated turbot |        |        |       |       |          |       |
|--------|----------------------------------|--------|--------|-------|-------|----------|-------|
|        | Skin                             | Spleen | Kidney | Liver | Heart | GI Tract | Gills |
| 3 hpi  | +                                | +      | +      | -     | -     | -        | -     |
| 6 hpi  | +                                | +      | +      | -     | -     | -        | -     |
| 24 hpi | +                                | +      | +      | -     | -     | -        | -     |
| 48 hpi | +                                | +      | +      | -     | -     | -        | -     |
| 72 hpi | +                                | +      | +      | -     | -     | -        | -     |
| 7 dpi  | +                                | +      | +      | -     | -     | -        | -     |

**Table 1.** Immunohistochemical detection of *T. maritimum* in different organs of subcutaneously inoculated turbot at each sampling point.

The bacterial antigen was also observed in areas with severe ulcerative dermatitis (Figures 3 D and 3 E). In these locations, phagocyte cells showed the cytoplasm with a strong immunostaining against the bacterial antigen (Figure 3 insert).

In spleen, the immunoreactivity was distributed mainly in the cytoplasm of macrophages located around the ellipsoids from 3 hpi to the end of the experiment (Figures 4 A and 4 B). In kidney a large number of positive macrophages randomly distributed in the renal interstitial tissue and within and around peritubular capillaries was detected from 3 hpi to the end of the experiment (Figures 4 D and 4 E).

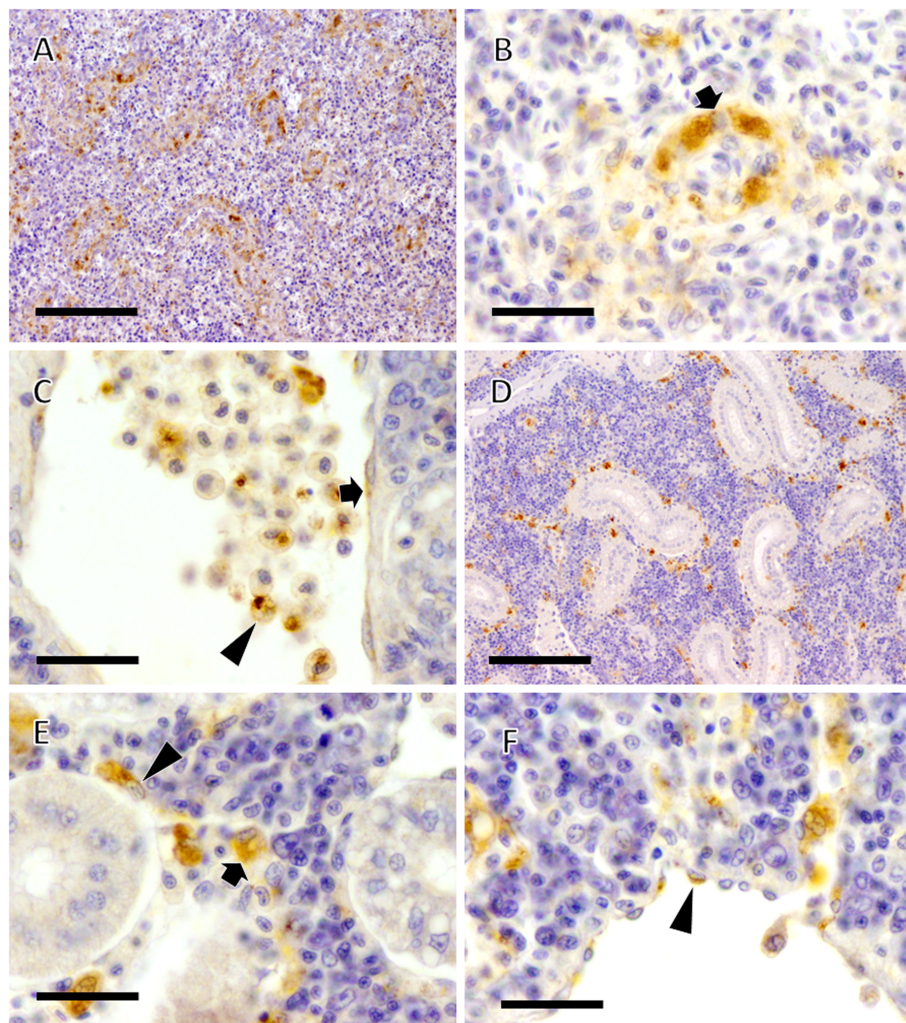
Moreover, bacterial antigen was detected within the sinusoids in the cytoplasm of macrophage cells and in the cytoplasm of endothelial cells in both organs (Figures 4 C and 4 F).



---

**Figure 3.** Immunohistochemistry against *T. maritimum* antigen in SC experiment. **A.** Strong immunostaining in the point of inoculation (asterisk) at 3 hpi. Bar 500  $\mu\text{m}$ . **B.** Immunopositivity in the cytoplasm of phagocyte cells in the point of inoculation in the hypodermis (asterisk) at 24 hpi. Bar 200  $\mu\text{m}$ . **C.** Severe necrosis in the muscles (asterisk) and strong immunostaining in the cytoplasm of phagocyte cells at 24 hpi. Bar 200  $\mu\text{m}$ . **D.** Ulcer with muscles exposed and a high number of phagocyte cells with positive staining in the cytoplasm at 7 dpi. Bar 100  $\mu\text{m}$ . **E.** Muscular fibers displayed evident degeneration and necrosis with strong immunostaining in the inflammatory cells at 7 dpi. Bar 100  $\mu\text{m}$ . **Insert.** Detail of phagocyte cells detected in the damaged areas with the cytoplasm strongly stained. Bar 10  $\mu\text{m}$ .

---

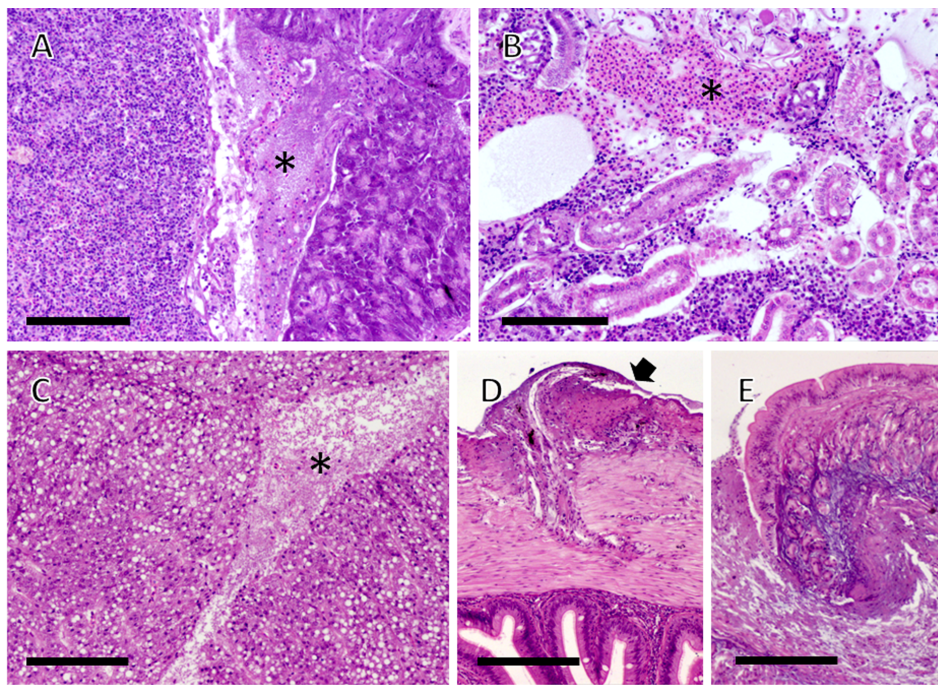


**Figure 4.** Immunohistochemistry against *T. maritimum* antigen in SC experiment. **A.** Distribution of bacterial antigen around the ellipsoids in spleen. Bar 100  $\mu\text{m}$ . **B.** Capillary ellipsoid in spleen surrounded by round cells (arrow) with a strong positivity in the cytoplasm. Bar 20  $\mu\text{m}$ . **C.** Sinusoid in the spleen with positive round cells in bloodstream (arrowhead) and endothelial cells with positive cytoplasm (arrow). Bar 20  $\mu\text{m}$ . **D.** Distribution of bacterial antigen in the peritubular capillaries of kidney. Bar 100  $\mu\text{m}$ . **E.** Macrophages into the peritubular capillaries with cytoplasm positive against the antibody (arrowhead) and distributed between the cells of parenchyma of the kidney (arrow). Bar 20  $\mu\text{m}$ . **F.** Endothelial cells in sinusoids of kidney with cytoplasm staining with the antibody (arrowhead). Bar 20  $\mu\text{m}$ .

*7.3.3.2. IP experiment*

Neither microscopical lesions nor reactivity with the antibody anti-Tm were detected along the experiment in the skin of turbot IP injected.

In the animals inoculated with HD, the spleen showed inflammatory cells and necrosis in the serosa, extending to the pancreas (Figure 5 A). Extensive haemorrhage was observed in the parenchyma of kidney, with necrosis and depletion of haematopoietic tissue (Figure 5 B). The liver showed multifocal areas of necrosis with slight inflammatory response and haemorrhage (Figure 5 C). In the gastrointestinal tract, the inflammatory cells were observed extending from the serosa to the muscular layer along with haemorrhage and necrosis (Figure 5 D). Moreover, in some areas of the mucosa it could be seen a slight epithelial desquamation and presence of inflammatory cells (Figure 5 E). In general, in the affected organs, the damage was very extensive and spreading from the serous layer of the organs to the central parenchyma.



**Figure 5.** IP experiment **A.** Spleen with a necrotic zone (asterisk) in the serosa and extending into the pancreas at 7 dpi. H-E. Bar 100  $\mu$ m. **B.** Kidney showing haemorrhage, necrosis (asterisk) and depletion of haematopoietic tissue at 7 dpi. H-E. Bar 100  $\mu$ m. **C.** Liver with necrotic area in the parenchyma (asterisk) at 7 dpi. H-E. Bar 100  $\mu$ m. **D.** Intestinal tract showed inflammation and necrosis (arrow) that extends from serous layer to muscular layer at 6 hpi. H-E. Bar 200  $\mu$ m. **E.** Sample of gastric with loss of epithelium and presence of mild inflammatory response at 6 hpi. H-E. Bar 200  $\mu$ m.

---

The spleen and kidney from HD inoculated turbot showed immunopositivity against the bacterial antigen from 6 hpi to the end of the study (Table 2). In the LD group, the bacterial antigen was detected only at 6 hpi and at 24 hpi in spleen and kidney. In both groups, the immunoreactivity displayed a similar distribution that in subcutaneously injected fish.

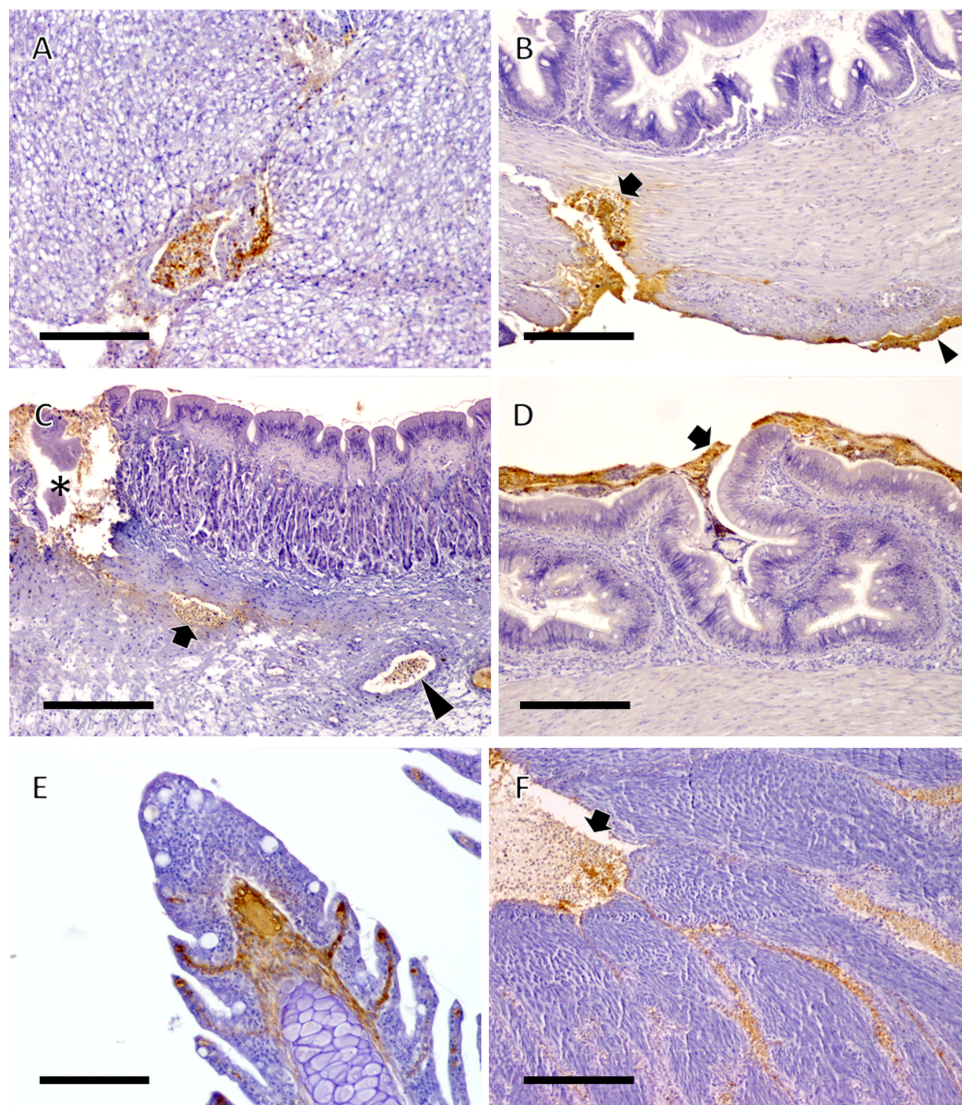
Occasionally, in liver from turbot of HD experiment, immunopositive cells were detected in serosa and in necrotic areas in the parenchyma (Table 2, Figure 6 A).

In addition, in some fish of HD experiment, the gastrointestinal tract displayed positive bacterial antigen in serosa and in some areas, the immunostaining spreaded to the muscular layer (Figure 6 B) reaching the mucosal surface, where there was also a strong and extensive positive staining in necrotic areas and vessels (Figures 6 C and 6 D).

In turbot from the HD experiment, gills displayed strong positive staining into vessels especially on the top of lamellas (Figure 6 E). In the heart, immunostaining was seen into the cytoplasm of macrophage cells located into the sinus venous (Figure 6 F).

|        | Intraperitoneally inoculated turbot |    |        |    |        |    |       |    |       |    |          |    |       |    |
|--------|-------------------------------------|----|--------|----|--------|----|-------|----|-------|----|----------|----|-------|----|
|        | Skin                                |    | Spleen |    | Kidney |    | Liver |    | Heart |    | GI Tract |    | Gills |    |
|        | LD                                  | HD | LD     | HD | LD     | HD | LD    | HD | LD    | HD | LD       | HD | LD    | HD |
| 3 hpi  | -                                   | -  | -      | -  | -      | -  | -     | -  | -     | -  | -        | -  | -     | -  |
| 6 hpi  | -                                   | -  | +      | +  | +      | +  | -     | +  | -     | +  | -        | +  | -     | +  |
| 24 hpi | -                                   | -  | +      | +  | +      | +  | -     | +  | -     | +  | -        | +  | -     | +  |
| 48 hpi | -                                   | -  | -      | +  | -      | +  | -     | +  | -     | +  | -        | +  | -     | +  |
| 72 hpi | -                                   | -  | -      | +  | -      | +  | -     | -  | -     | -  | -        | -  | -     | -  |
| 7 dpi  | -                                   | -  | -      | +  | -      | +  | -     | -  | -     | -  | -        | -  | -     | -  |

**Table 2.** Immunohistochemical detection of *T. maritimum* in different organs of intraperitoneally inoculated turbot at each sampling point.



**Figure 6.** Immunohistochemistry against *T. maritimum* antigen in IP experiment. **A.** Liver with a necrotic area in the parenchyma and a marked immunostaining. Bar 100  $\mu\text{m}$ . **B.** Intestinal tract showed necrosis with positive staining extending from serous layer (arrowhead) to muscular layer (arrow). Bar 200  $\mu\text{m}$ . **C.** Immunopositivity in muscular layers (arrow), vessels (arrowhead) and necrotic area (asterisk) in the mucosa of gastrointestinal tract. Bar 200  $\mu\text{m}$ . **D.** Intestinal surface showing evident immunostaining (arrow). Bar 200  $\mu\text{m}$ . **E.** Gill with strong positive staining into vessels on the top of lamellas. Bar 100  $\mu\text{m}$ . **F.** Immunostaining in heart into the sinus venous (arrow). IHC. Bar 200

#### **7.4. DISCUSSION**

The present study provides the first description of morphopathological and immunohistochemical changes in the tissues of turbot experimentally infected with *T. maritimum* by subcutaneous and intraperitoneal inoculation. The experiments showed that injection by both routes are able to reproduce the disease and are reliable to study the pathogenesis, although by the IP injection the cutaneous lesions were not reproduced. In addition, in the IP experiment a higher concentration of bacteria was necessary to cause damage in the internal organs and to detect the bacterial antigen in a large number of organs. Besides, the subcutaneous inoculation in the dorsal medium sinus, reproduces tenacibaculosis in similar way to natural infection, according to gross and microscopic lesions previously described (Alsina and Blanch 1993, Pazos et al. 1993, Handler 1997, Cepeda and Santos 2002, van Gelderen 2011, Vilar et al. 2012).

Histopathological descriptions about tenacibaculosis are scant and mainly focused in gills and ulcerative lesions in skin (Chen et al. 1995, Handler et al. 1997, Powell et al. 2004, Olsen et al. 2011, van Gelderen et al. 2011) with scarce references on distribution of bacterial antigen in skin and internal organs.

In the SC inoculation, an inflammatory response in the point of inoculation was observed at 6 hpi to the end of the experiment. In the muscles, histopathological changes started with mild degenerative changes and finally extensive areas of necrosis were observed. Similar

pathological changes have been observed in salmonids (Handler et al. 1997) and sole (Vilar et al. 2012). In the fish IP inoculated with *T. maritimum*, no lesions were observed in skin and muscular samples along the entire study. However, organs in coelomic cavity showed an inflammatory response in different serosas and necrosis in spleen, kidney, liver and gastrointestinal tract.

Immunohistochemical analysis was able to identify *T. maritimum* antigen in both experiments showing different pattern of distribution according to the route of inoculation. Interestingly, SC route was faster than IP route with regard to the distribution of *T. maritimum* in fish tissues since bacterial antigen was observed at 3 hpi and throughout the experiment in kidney and spleen; and later at 6 hpi in spleen and kidney of turbot intraperitoneally inoculated with the HD bacterial suspension.

In our study, a strong positive reaction was observed in the hypodermis in the point of inoculation, associated with bacterial antigen detection within blood vessels. This finding could demonstrate that *T. maritimum* invades the bloodstream and rapidly establish a bacteremia. Similar positive reaction was reported by Lovoll et al. (2009) in Atlantic salmon infected by *Moritella viscosa*. These authors also reported that extracellular products could be part of an invasion strategy of the bacterium using bloodstream to spread and facilitate a systemic infection. In this sense, it has been reported that extracellular products from *T. maritimum* possess several virulence factors like toxins and enzymes (Baxa et al. 1988, Handler et al. 1997, Pazos 1997, van Gelderen et al. 2009) which have high proteolytic and haemolytic

activity (Pazos 1997) and cause necrosis (van Gelderen et al. 2009). For this reason, it is suggested in the current study that *T. maritimum* could follow the same strategy to damage the tissue and reach the bloodstream reported to *M. viscosa* (Lovoll et al. 2009). Besides, in the cutaneous lesions granulocytes and macrophages are the main inflammatory cells observed. Therefore, fish phagocytes would not only be able to respond to pathogen-derived molecules (Sepulcre et al. 2007) but also to endogenous molecules, such as collagen derived proteolytic fragments, that would signal the presence of damage (Oppenheim and Yang 2005). In fact, recently have been proved that collagen proteolytic fragments may be detected by phagocytic cells in gilthead seabream (Castillo-Briceño y col. 2009). This finding would indicate that inflammatory response, mainly composed by phagocytes, would be intenser in areas where the tisular damage was more evident and the release of inflammatory mediators from these cells might contribute to the damage.

In the current study, gastrointestinal tract displayed positive bacterial antigen in serosa, spreading to the muscular layer and reaching the mucosal surface, where the bacterial antigen was detected above the epithelium. This finding supports the hypothesis that the intestine of infected fish could be a reservoir of the bacteria.

Moreover, erosion, necrosis and bacterial filamentous mats in gills have been reported associated with *T. maritimum* in salmonids (van Gelderen et al. 2010, Mitchell and Rodger 2011). However, in the present study, the presence of *T. maritimum* antigen in blood vessels of gills as well as the absence of histological lesions may point to the

arrival of the pathogen at this organ by bloodstream, although future studies should be performed to elucidate the role of the gills in the pathogenesis of the disease.

In summary, both routes of inoculation are able to cause infection and bacteraemia in the fish. However, subcutaneous route reproduces the disease faster and in a more similar way than intraperitoneal route. Macroscopic and microscopic findings indicate that *T. maritimum* cause a great local damage in the point of entry and triggers an inflammatory response. Finally, bacterium spreads along the internal organs easily, but needs a gateway to penetrate in the organism and this portal of entry could be skin.

## **7.5. REFERENCES**

Alsina M, Blanch AR (1993). First isolation of *Flexibacter maritimus* from cultivated turbot (*Scophthalmus maximus*). Bulletin European Association Fish Pathology 13:157-160.

Avendaño-Herrera R, Irgang R, Magariños B, Romalde JL, Toranzo AE (2006a). Use of microcosms to determine the survival of the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum* in seawater. Environmental Microbiology 8:921-928.

Avendaño-Herrera R, Toranzo AE, Magariños B (2006b). A challenge model for *Tenacibaculum maritimum* infection in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). Journal of Fish Diseases 29:371-374.

Baxa DV, Kawai K, Kusuda R (1986). Characteristics of gliding bacteria isolated from diseased cultured flounder, *Paralichthys olivaceous*. Fish Pathology 21:251-258.

Baxa DV, Kawai K, Kusuda R (1987). Experimental infection of *Flexibacter maritimus* in black sea bream (*Acanthopagrus schlegeli*) fry. *Fish Pathology* 22:105-109.

Baxa DV, Kawai K, Kusuda R (1988). *In vitro* and *in vivo* activities of *Flexibacter maritimus* toxins. *Bulletin of Marine Sciences and Fisheries, Kochi University* 10:1-8.

Bernardet JF, Campbell AC, Buswell JA (1990). *Flexibaxter maritimus* is the agent of “black patch necrosis” in Dover sole in Scotland. *Diseases of Aquatic Organisms* 8:233-237.

Bernardet JK, Kerouault B, Michel C (1994). Comparative study on *Flexibacter maritimus* strains isolated from farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in France. *Fish Pathology* 29:105-111.

Bernardet JF, Nakagawa Y, Holmes B (2002). Proposed minimal standards for describing new taxa of the family *Flavobacteriaceae* and emended description of the family. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52:1049-1070.

Castillo-Briceño P, Sepulcre MP, Chaves-Pozo E, Meseguer J, García-Ayala A, Mulero V (2009). Collagen regulates the activation of professional phagocytes of the teleost fish gilthead seabream. *Molecular Immunology* 46:1409-1415.

Cepeda C, Santos Y (2002). First isolation of *Flexibacter maritimus* from farmed Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) in Spain. *Bulletin European Association Fish Pathologists* 22:388-392.

Cepeda C, García-Márquez S, Santos Y (2003). Detection of *Flexibacter maritimus* in fish tissues using nested PCR amplification. *Journal of Fish Diseases* 26:65-70.

Chen ME, Henry-Ford D, Groff JM (1995). Isolation and characterization of *Flexibacter maritimus* from marine fishes of California. *Journal of Aquatic Animal Health* 7:318-326.

Chiavolini D, Pozzi G, Ricci S (2008). Animal models of *Streptococcus pneumoniae* disease. *Clinical Microbiology Reviews* 21: 666–685.

Handlinger J, Soltani M, Percival S (1997). The pathology of *Flexibacter maritimus* in aquaculture species in Tasmania, Australia. *Journal of Fish Diseases* 20:159-168.

LaPatra SE, Plant KP, Alcorn S, Ostland V, Winton J (2010). An experimental vaccine against *Aeromonas hydrophila* can induce protection in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 33:143-151.

Ling SHM, Wang XH, Lim TM, Leung KY (2001). Green fluorescent protein-tagged *Edwardsiella tarda* reveals portal of entry in fish. *FEMS Microbiology Letters* 194:239-243.

Lovoll M, Wiik-Nielsen CR, Tunsjo HS, Colquhoun D, Lunder T, Sorum H, Grove S (2009). Atlantic salmon bath challenged with *Moritella viscosa*-Pathogen invasion and host response. *Fish and Shellfish Immunology* 26:877-884.

Mitchell SO, Rodger HD (2011). A review of infectious gill disease in marine salmonid fish. *Journal of Fish Diseases* 34:411-432.

Olsen AB, Nilsen H, Sandlund N, Mikkelsen H, Sorum H, Colquhoun DJ (2011). *Tenacibaculum* sp. associated with winter ulcers in sea-reared Atlantic salmon *Salmo salar*. *Diseases of Aquatic Organisms* 94:189-199.

Oppenheim JJ, Yang D (2005). Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Current Opinion in Immunology* 17:359-365.

Ostland VE, LaTrace C, Morrison D, Ferguson HW (1999). *Flexibacter maritimus* associated with a bacterial stomatitis in Atlantic salmon smolts reared in net-pens in British Columbia. *Journal of Aquatic Animal Health* 11:35-44.

Pazos F, Santos Y, Núñez S, Toranzo AE (1993). Increasing occurrence of *Flexibacter maritimus* in marine aquaculture of Spain. *Fish Health Section. Asian Fisheries Society. Newsletter*. 21:1-2.

Pazos F, Santos Y, Macías AR, Núñez S, Toranzo AE (1996). Evaluation of media for the successful culture of *Flexibacter maritimus*. *Journal of Fish Diseases* 19:193-197.

Pazos F (1997). "Flexibacter maritimus": estudio fenotípico, inmunológico y molecular. Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain.

Pepin JF, Emery E (1993). Marine *Cytophaga*-like bacteria (CLB) isolated from diseased reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) from French Mediterranean coast. Bulletin European Association Fish Pathologists 13:165-167.

Powell M, Carson J, van Gelderen R (2004). Experimental induction of gill disease in Atlantic salmon *Salmo salar* smolts with *Tenacibaculum maritimum*. Diseases of Aquatic Organisms 61:179-185.

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

Ringø E, Myklebust R, Mayhew TM, Olsen RE (2007). Bacterial translocation and pathogenesis in the digestive tract of larvae and fry. Aquaculture 268:251-264.

Santos Y, Romalde JL, Bandín I, Magariños B, Núñez S, Barja JL, Toranzo AE (1993). Usefulness of the API-20E system for the identification of bacterial fish pathogens. Aquaculture 116:111-120.

Santos Y, Pazos F, Barja JL (1999). *Flexibacter maritimus*, causal agent of flexibacteriosis in marine fish. In: ICES identification leaflets for diseases and parasites of fish and shellfish. Ed: Oliver G. International Council for the Exploration of the Sea, Copenhagen, Denmark 55:1-6.

Sepulcre MP, López-Castejón G, Meseguer J, Mulero V (2007). The activation of gilthead seabream professional phagocytes by different PAMPs underlines the behavioural diversity of the main innate immune cells of bony fish. Molecular Immunology 44:2009–2016.

Smith PA, Pizarro P, Ojeda P, Contreras J, Oyanedel S, Larenas J (1999). Routes of entry of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Diseases of Aquatic Organisms 37:165-172.

Toranzo AE, Magariños B, Romalde JL (2005). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* 246:37-61.

van Gelderen R, Carson J, Nowak B (2009). Effect of extracellular products of *Tenacibaculum maritimum* in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* 32:727-731.

van Gelderen R, Carson J, Nowak B (2010). Experimentally induced marine flexibacteriosis in Atlantic salmon smolts *Salmo salar*. I. Pathogenicity. *Diseases of Aquatic Organisms* 91:121-128.

van Gelderen R, Carson J, Nowak B (2011). Experimentally induced marine flexibacteriosis in Atlantic salmon smolts *Salmo salar*. II. Pathology. *Diseases of Aquatic Organisms* 95:125-135.

Vilar P, Faílde LD, Bermúdez R, Vigliano F, Riaza A, Silva R, Santos Y, Quiroga MI (2012). Morphopathological features of a severe ulcerative disease outbreak associated with *Tenacibaculum maritimum* in cultivated sole, *Solea senegalensis* (L.). *Journal of Fish Diseases* 35:437-445.

Wakabayashi H, Hikida M, Masumura K (1984). *Flexibacter* infection in cultured marine fish in Japan. *Helgol Meeresunters* 37:587-593.

Wakabayashi H, Hikida M, Masumura K (1986). *Flexibacter maritimus* sp. nov., a pathogen of marine fishes. *International Journal of Systematic Bacteriology* 36:396-398.



**CAPÍTULO 8.**  
**EVALUATION OF IMMUNE RESPONSE IN TURBOT**  
**(*Psetta maxima* L.) TENACIBACULOSIS:**  
**HAEMATOLOGICAL AND**  
**IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDIES**



## **8.1. INTRODUCTION**

The control of tenacibaculosis by antimicrobial compounds is limited by the fast appearance of resistant strains (Avendaño-Herrera et al. 2008). Therefore, the establishment of effective prophylactic measures is the best alternative to combat the disease. The vaccination proved to be effective for the control of tenacibaculosis and to evoke a specific humoral immune response (Pazos 1997, Santos et al. 1999). Moreover, El Morabit et al. (2006) demonstrated that turbot head kidney leukocytes displayed a notable phagocytic ability (46 %) and increased respiratory burst activity using formalin-killed cells of *Tenacibaculum maritimum* as target particles. Unfortunately, little is known about the nature of the immune response that is elicited after exposition of the fish to *T. maritimum* alive cells. Recently, García-Lamas et al. (2010) have reported variations in the lysozyme, bactericidal and complement activity of serum from turbot experimentally infected with *T. maritimum*. However, in this study no information is provided with regard to the specific immune response.

It is known that the main features of the adaptive immune system are present in fish as in other vertebrates (Álvarez-Pellitero 2008, Magnadóttir 2010). The mechanisms involved in specific humoral defense have been the most exhaustively studied of all the modes of fish disease resistance (Iwama and Nakanishi 1996). In fact, some authors have indicated that investigations focused in this field could provide appropriate tools to modulate the fish immune function and make the vaccination strategies more effective (Iwama and Nakanishi

1996). Generally, pathogens trigger a humoral response that is characterized by an early rise of immunoglobulin levels (Boes 2000), specifically immunoglobulin M (IgM), which is a major component of the teleost humoral system (Cuesta et al. 2004, Zaccone and Mancuso 2008) and has functions in the immediate defense to bacterial infection (Boes et al. 1998). Among the immunoglobulin positive cells (Ig+ cells) present in the fish tissues, B-lymphocytes and plasma cells are the major cell subtypes (Imagawa et al. 1991, Fournier-Betz et al. 2000, Tokuda et al. 2000, Bermúdez et al. 2006). It has been proposed that the assessment of total Ig levels could be used not only for the diagnosis of diseases, but also to obtain information that can be useful to implement preventive measures in aquaculture (Cuesta et al. 2004). To date, several studies have evaluated the humoral immune response of fish by means of different techniques, but few of them have used immunohistochemistry (IHC) to characterize the in situ localization of immunoglobulin-bearing cells (Imagawa et al. 1991, Falk et al. 1995, Bermúdez et al. 2006, Haugarvoll et al. 2010, Salinas et al. 2011). It is well known that in mammals haematologic parameters are a valuable tool for the diagnosis of the diseases. On the other hand, haematologic evaluation can be useful in monitoring the health status of fish although it has not always been used because of the difficulty to obtain samples, the challenges involved in evaluating hemograms and the lack of meaningful reference intervals to aid in interpretation.

The main goal of this work was to study the number and distribution of Ig+ cells in turbot challenged with *T. maritimum* by IHC methods, in order to assess the kinetics of these cells and gain insight into the pathogenesis of the tenacibaculosis. In addition, the haematocrit and

circulating cells of blood were analyzed to characterize the haemathological changes suffered during turbot tenacibaculosis.

## **8.2. MATERIALS AND METHODS**

### **8.2.1. Fish**

Sixty uninfected turbot with an average weight of  $33.43 \pm 8.4$  g were obtained from a farm in Northwest Spain. The animals were fed with a commercial diet and reared in 500 l tanks (length 115 x width 96 x depth 65 cm), aerated and supplied with sand-filtered seawater at 18°C and 32‰ salinity until the experiments started after the quarantine period.

### **8.2.2. Infection**

Fish employed in the study came from a previous experiment where fish were randomly divided into challenged and control groups. Challenged group (30 fish) was subcutaneously inoculated in dorsal medium sinus of the ocular side with 0.1 ml of the bacterial suspension ( $10^8$  cfu/fish) of strain LL01.8.3.8 of *T. maritimum*. Control group (30 fish) received 0.1 ml of saline sterile solution in the same area.

### **8.2.3. Sampling procedure**

Fish were sampled at 3, 6, 24, 48, 72 h post-inoculation (hpi) and 7 days post-inoculation (dpi). At each sampling point, five fish from

both challenged and control groups were randomly selected. Then, fish were euthanized by overexposure to the anesthetic Tricaine methane sulphonate (MS222) (Sigma-Aldrich, Germany). Thereafter, samples of skin lesions and underlying muscle, spleen, kidney, intestine (anterior, medium and posterior) and thymus were dissected out, cut into small pieces and fixed in Bouin's fluid at 4°C for 12 h and embedded in paraffin.

#### **8.2.4. Haematological studies**

Before necropsies, fish were bled from the caudal vein and blood samples were drawn into heparinized capillary tubes, centrifuged at 13700 x g for 2 min, and the haematocrit measured. The percentages of the different types of leukocytes in peripheral circulating blood were determined from the blood smears counting a minimum of 200 leukocytes. The different cell types were identified by their morphology, size and staining characteristics, following similar criteria to those established by Quentel and Obach (1992). The percentage of the different leukocyte types is relative to the total number of leukocytes.

#### **8.2.5. Histology and immunohistochemistry**

Sections 2-3 µm in thickness were collected on silane coated slides, allowed to dry overnight and then dewaxed and hydrated. The sections were stained with hematoxylin-eosin (H-E).

For the IHC, all incubations were performed at room temperature in a humid chamber and all washing procedures consisted of three successive 5 min immersions in phosphate-buffered saline (PBS; 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 0.5% (v/v) Tween 20, pH 7.4). Endogenous peroxidase activity was quenched by incubating in Peroxidase Blocking Reagent (Dako, Denmark) for 30 min, and after a rinse in PBS, antigens were exposed by heating under pressure in a pressure-cooker for 8 min in 10 mM sodium citrate buffer, pH 6.0. The sections were then washed again and incubated with a rabbit polyclonal anti-turbot IgM antibody (provided by Dr. Karl Pedersen at the Danish Veterinary Laboratory, Denmark) for 2 h, washed and incubated for 30 min with an anti-rabbit EnVision+ System Labelled Polymer-HRP (Dako). After rinsing, the sections were finally developed using as chromogen diaminobenzidine (Dako), washed in water, counterstained with hematoxylin, dehydrated and mounted. Negative controls were carried out substituting the primary antibody or the secondary antibody for PBS or an irrelevant polyclonal antibody. All the immunostaining series were performed using an autostainer instrument (Autostainer Universal Staining System, Dako), in order to standardize the technique avoiding variations in times of incubation, development and counterstaining.

#### **8.2.6. Quantitative analysis of Ig<sup>+</sup> cells**

Images were captured using an Olympus DP12 camera connected to a photomicroscope Olympus BX50. Five digitized images were randomly collected from each organ (spleen, kidney, thymus, and anterior, medium and posterior intestine), using 200X magnification

objective. The camera had its auto mode turned off and manual controls were used to keep parameters at the same levels during the entire study. The number of Ig<sup>+</sup> cells was counted using the software Image Pro Plus 4 (Media Cybernetics Inc. Bethesda, MD).

### **8.2.7. Statistics**

The differences in the haematological values as well as the number of Ig<sup>+</sup> cells between challenged and control groups were statistically assessed. Data on the number of Ig<sup>+</sup> cells from each organ were separately analyzed. The number of Ig<sup>+</sup> cells in the intestine were pooled in order to simplify the statistical analysis and the reading of the results. In all cases, a Mann Whitney test was employed to detect differences between challenged and control groups at each sampling point. A Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks followed by Dunn's method was used to look for differences between the six sampling points within each group.

The statistical analyses were performed using Sigma Stat software (SPSS Inc., Chicago, IL). The results are expressed as mean  $\pm$  SEM and in all cases, the minimum significance level was set at  $P < 0.05$ .

### **8.3. RESULTS**

#### **8.3.1. Histopathology**

Briefly, in the ulcerative areas there was a complete loss of epidermis, dermis and hypodermis, leaving the underlying muscle exposed. Moreover, extensive necrosis was also observed affecting the superficial muscle bundles with a mild inflammatory response associated. In the periphery of ulcers, scales were detached and scale pockets appeared filled with oedematous liquid and inflammatory cells.

#### **8.3.2. Haematological values**

*Haematocrit.* The values of haematocrit of fish infected with *T. maritimum* were always lower than those observed in fish from the control group. However, there were no statistically significant differences between both groups in the sampling points analyzed (Figure 1).

*Blood leukocytes.* Some differences in the percentage of the distinct type of leukocytes were detected in fish challenged with *T. maritimum* with respect to the control group (Figure 1, Table 1). Briefly, the percentage of granulocytes exhibited significant variations in the challenged group, reaching the highest value at 24 hpi. Besides, statistically significant differences were detected between fish challenged with *T. maritimum* and control fish at 3, 24, 48 and 72 hpi (Figure 1, Table 1). Moreover, statistically significant differences

between sampling points were observed in challenged group (sampling 24 hpi respect to 6 hpi and 7 dpi) (Figure 1).

On the other hand, the percentage of lymphocytes suffered a great decrease at the first samplings and then a progressive increase in the group of challenged fish reaching values similar to those observed in the control fish at the last sampling. Statistically significant differences between challenged and control fish were observed at 3, 6 and 24 hpi (Figure 1, Table 1). In all sampling points, the percentage of lymphocytes in the challenged group was lower than in the control group. Moreover, there were statistically significant differences in the percentage of lymphocytes observed in the samples of fish infected with *T. maritimum* obtained after 3, 6 and 24 hpi with respect to those obtained after 7 dpi (Figure 1, Table 1).

Finally, the percentage of thrombocytes in the challenged group tended to decrease along the experiment showing significant differences with the control group at 6 and 72 hpi (Figure 1, Table 1). Furthermore, in the group of fish challenged with the bacterium, significant differences between sampling points were observed (sampling 3 hpi respect to 48 hpi and 6 hpi respect to 48 hpi and 72 hpi) (Figure 1).

### **8.3.3. Morphology of Ig<sup>+</sup> cells**

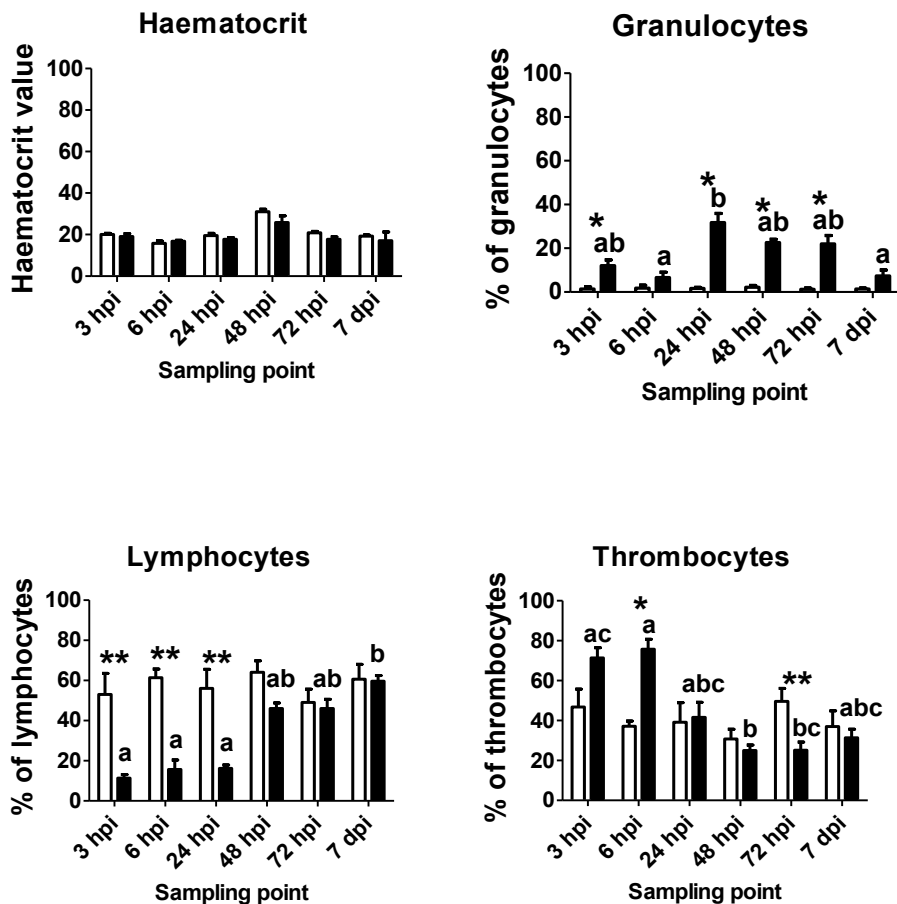
Immunoreactive cells for the anti-turbot IgM antibody were detected in the intestine, spleen, kidney and thymus from both challenged and control fish, and only in skin from the challenged fish (Figure 2).

Controls for non-specific staining did not show immunoreactivity (data not shown).

|                        | 3 hpi     |             | 6 hpi       |              | 24 hpi    |             |
|------------------------|-----------|-------------|-------------|--------------|-----------|-------------|
|                        | Control   | Challenged  | Control     | Challenged   | Control   | Challenged  |
| Haematocrit (%)        | 20±0.61   | 19±1.38     | 15.8±1.16   | 16.8±0.49    | 19.5±1.14 | 17.7±0.89   |
| Lymphocytes (%)        | 53±10.5** | 11.4±1.75** | 61.4±4.27** | 15.6±4.76**  | 56±9.56** | 16.2±1.69** |
| Thrombocytes (%)       | 46.8±8.96 | 71.4±5.14   | 37.2±2.58*  | 75.8±4.89*   | 39.2±9.75 | 41.6±7.63   |
| Granulocytes (%)       | 1.4±0.93* | 12±2.74*    | 1.8±1.36    | 6.6±2.46     | 1.6±0.51* | 31.8±4.13*  |
| Ig+ cells in spleen    | 50.4±8.23 | 71.4±18.51  | 44.2±3.6*   | 108.4±31.12* | 60±15.55* | 196±42.44*  |
| Ig+ cells in kidney    | 43.2±9.07 | 69±10.75    | 33±3.63     | 57.4±16.82   | 58.2±8.52 | 48±10.5     |
| Ig+ cells in intestine | 24.4±4.08 | 26±3.9      | 24.8±4.42   | 28±5.48      | 35.8±6.74 | 38.6±6.59   |
| Ig+ cells in thymus    | 10.8±2.04 | 12.6±1.36   | 9.8±2.25    | 7.4±1.97     | 12.4±0.68 | 19.8±3.15   |

|                        | 48 hpi      |              | 72 hpi      |             | 7 dpi       |             |
|------------------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                        | Control     | Challenged   | Control     | Challenged  | Control     | Challenged  |
| Haematocrit (%)        | 31±1.2      | 25.8±3.21    | 20.9±0.62   | 17.7±1.15   | 19.3±0.46   | 17±4.27     |
| Lymphocytes (%)        | 64±5.82     | 46±2.79      | 49±6.64     | 46±4.64     | 60.6±7.47   | 59.6±2.84   |
| Thrombocytes (%)       | 30.8±4.93   | 25±2.83      | 49.6±6.55** | 25.2±4.09** | 37±7.9      | 31.4±4.27   |
| Granulocytes (%)       | 2.2±0.73*   | 22.6±1.5*    | 1.2±0.58*   | 22±3.91*    | 1.4±0.4     | 7.4±2.66    |
| Ig+ cells in spleen    | 54.6±17.65* | 163.2±40.63* | 101.6±26.07 | 132±19.29   | 91.75±27.45 | 156.8±16.45 |
| Ig+ cells in kidney    | 40±8.44*    | 86.8±17.1*   | 38.2±9.45*  | 98.2±18.15* | 46.5±5.33*  | 152±9.23*   |
| Ig+ cells in intestine | 21.6±3.66*  | 41.6±5.93*   | 30.4±7.36   | 39.4±5.61   | 30.75±1.65  | 38.75±8.38  |
| Ig+ cells in thymus    | 10.6±4.2    | 23.8±8.73    | 24±2.7      | 19.2±3.61   | 10.75±2.43  | 63.75±43.8  |

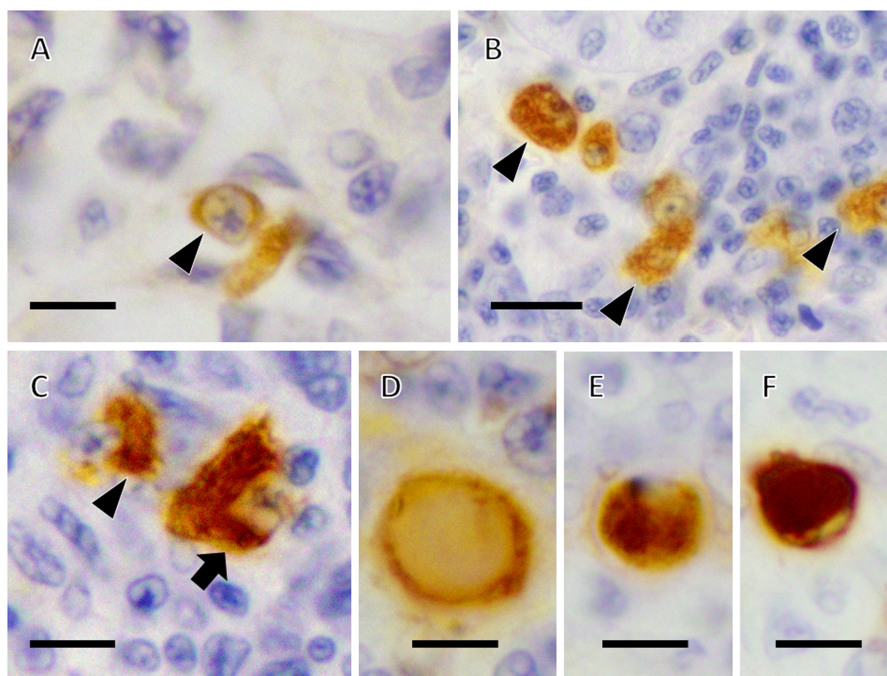
**Table 1.** Haematological values and number of Ig+ cells (mean ± SEM) for control and challenged fish at the different times post inoculation. Statistical symbols: \*, significant difference between control and challenged fish at  $P < 0.05$ ; \*\*, significant difference between control and challenged fish at  $P < 0.001$ .



**Figure 1.** Haematological values of control and challenged groups throughout the experiment. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM. Statistically significant differences between control (white columns) and challenged fish (black columns) at each sampling point post inoculation are indicated by \* ( $P < 0.05$ ) and \*\* ( $P < 0.001$ ). Statistical differences within challenged group along the experimental period are indicated by different type of letters, letters shared in common indicate no significant differences between sampling points ( $P < 0.05$ ).

In all studied tissues from challenged and control fish, cells exhibiting a typical morphology of B-lymphocytes represented a small percentage of the Ig+ cells (Figure 2 A). They were rounded or slightly ovoid cells

with a large, round and centrally located nucleus, and with a small cytoplasm halo around the nucleus, resulting in a high nucleus: cytoplasm ratio. This cell type showed a strong diffuse or spotted-like immunostaining in the cytoplasm around the nucleus. A large number of plasma cells exhibiting varying states of differentiation were also observed (Figure 2 B). Generally, these cells displayed an ovoid to elongate shape and a variable amount of cytoplasm, depending on the degree of differentiation, so that the nucleus was located either centrally or eccentrically, occupying between one-half to one-quarter of the cell. By immunohistochemical staining, plasma cells showed a diffuse as well as a granular cytoplasmic staining. A small number of immunoreactive cells with morphological features typical of macrophages were also identified (Figure 2 C). They showed a homogeneous cytoplasmic immunostaining, and occasionally contained phagosome-like structures that were strongly positive. Finally, cells with very large immunoreactive cytoplasm, and eccentric and flattened basophilic nuclei morphologically compatible with Mott cells were seldom observed (Figures 2 D, 2 E and 2 F).



---

**Figure 2:** Photomicrographs of immunohistochemistry for anti-turbot IgM from challenged fish. **A.** Lymphocyte with perinuclear staining (arrowhead). Bar 5  $\mu$ m. **B.** Plasma cells exhibiting various stages of differentiation (arrowheads). Bar 10  $\mu$ m. **C.** Macrophage (arrow) and plasma cell (arrowhead). Bar 5  $\mu$ m. **D-F.** Mott cells with eccentric basophilic nucleus and large cytoplasm exhibiting different degrees of immunostaining. Bar 5  $\mu$ m.

---

#### 8.3.4. Kinetics of Ig<sup>+</sup> cells

For each studied organ, data on the number of Ig<sup>+</sup> cells from all the samplings were pooled. The number of Ig<sup>+</sup> cells in *T. maritimum* challenged fish peaked at 24 hpi in spleen showing significant statistical differences compared with control fish at 6, 24 and 48 hpi (Table 1). At later samplings, the number of immunopositive cells decreased in spleen (Figures 3, 4 A and 4 B). Contrary to that observed

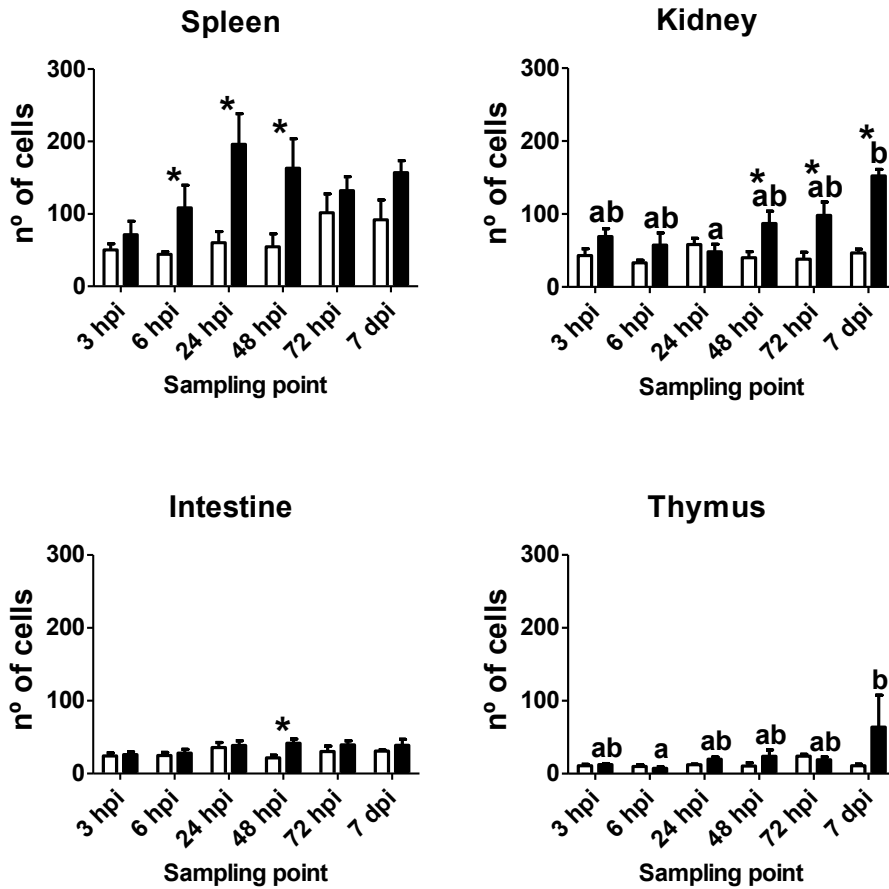
in spleen, in kidney the number of Ig<sup>+</sup> cells in challenged fish increased along the experiment to peak at 7 dpi, showing significant differences ( $P < 0.05$ ) compared with control fish at 48 hpi, 72 hpi and at 7 dpi. On the other hand, statistically significant differences between sampling points were observed within the group of fish challenged with *T. maritimum* (sampling 24 hpi respect to 7 dpi) (Figures 3, 4 C and 4 D).

In the intestine, statistical differences ( $P < 0.05$ ) were detected between challenged and control fish at 48 hpi (Table 1, Figures 3, 5 A and 5 B).

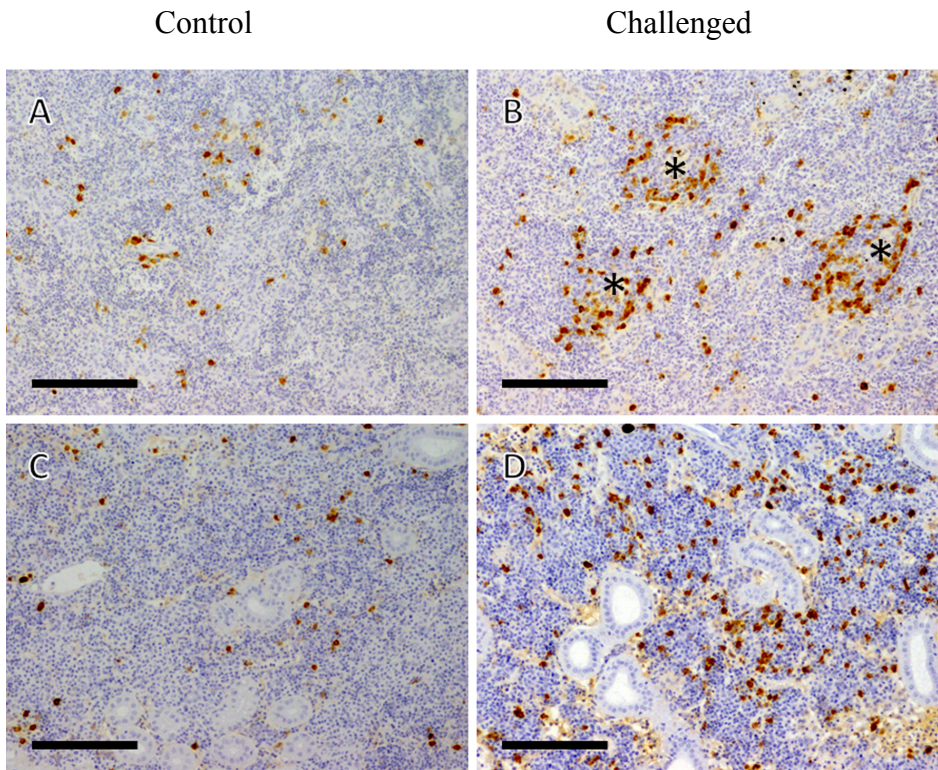
Thymus showed no significant differences between challenged and control groups at any sampling point, but the number of Ig<sup>+</sup> cells kept at low values in the first sampling and reached high amount of Ig<sup>+</sup> cells at 7 dpi (Figures 3, 5 C and 5 D).

No statistical analysis was performed in skin since no Ig<sup>+</sup> cells were observed at this level in control fish and the amount of Ig<sup>+</sup> cells in the challenged fish was very low. Nevertheless, a few Ig<sup>+</sup> cells were present in the cutaneous damaged areas from challenged fish as well as interstitial liquid showed an evident immunostaining (Figure 6 E).

On the other hand, serum into the vessels of studied organs (intestine, spleen, kidney, thymus and skin) from the challenged fish showed an increasingly immunoreactivity from the first samplings to 7 dpi, where the serum was strongly immunostained (Figures 4 B and 4 D, 5 B, 6 B and 6 C).



**Figure 3.** Number of Ig+ cells of control group (white columns) and challenged group (black columns). Each bar represents the mean  $\pm$  SEM. Statistically significant differences between control and challenged fish at each sampling point post inoculation are indicated by \* ( $P < 0.05$ ). Statistical differences within challenged group along the experimental period are indicated by different type of letters, letters shared in common indicate no significant differences between sampling points ( $P < 0.05$ ).



**Figure 4.** Immunohistochemistry for anti-turbot IgM. Differences in the number of Ig+ cells between control and challenged fish in spleen (A and B) at 24 hpi MMCs (asterisks) and kidney (C and D) at 7 dpi. Bar 100  $\mu$ m.

---

### 8.3.5. Localization of Ig+ cells within organs

#### 8.3.5.1. Spleen

In both challenged and control fish, isolated as well as clusters of few Ig+ cells were randomly distributed throughout the parenchyma, although in the challenged group tended to concentrate around melanomacrophage centres (MMCs) (Figure 6 A). This kind of arrangement was more evident at 24 hpi in challenged fish in which a higher number

of Ig<sup>+</sup> cells were located surrounding and even within MMCs. Occasionally Ig<sup>+</sup> cells were detected within blood vessels.

#### *8.3.5.2. Kidney*

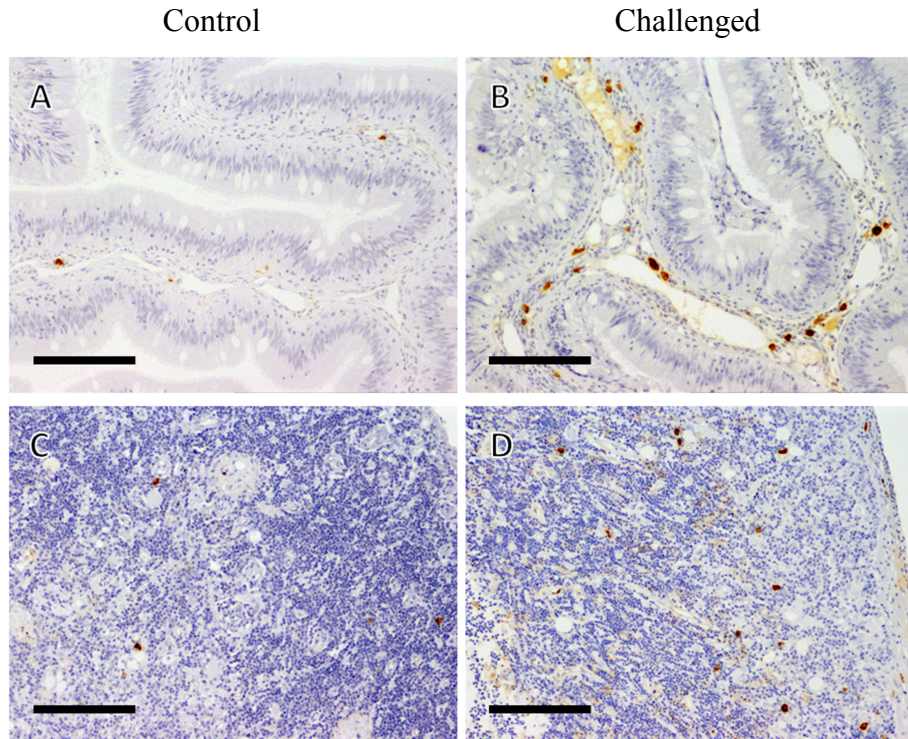
In control fish, Ig<sup>+</sup> cells were found scattered in the intertubular tissue tending to be present as individual cells (Figure 6 B). Occasionally, in challenged fish, in addition to isolated Ig<sup>+</sup> cells, small clusters of positive cells were also observed. The association of Ig<sup>+</sup> cells with MMCs in this organ could not be evidenced as in the spleen in either challenged or control fish.

#### *8.3.5.3. Intestine*

In the three studied portions of the intestine from challenged and control turbot, immunoreactive cells were mainly observed in the lamina propria submucosa (Figure 6 C), occasionally within the basal part of the epithelium and seldom in the muscular layer.

#### *8.3.5.4. Thymus*

In thymus of both challenged and control turbot, Ig<sup>+</sup> cells were diffusely scattered in the parenchyma, mainly in the inner zone of the thymus and in the transitional area in contact with the outer zone (Figure 6 D).



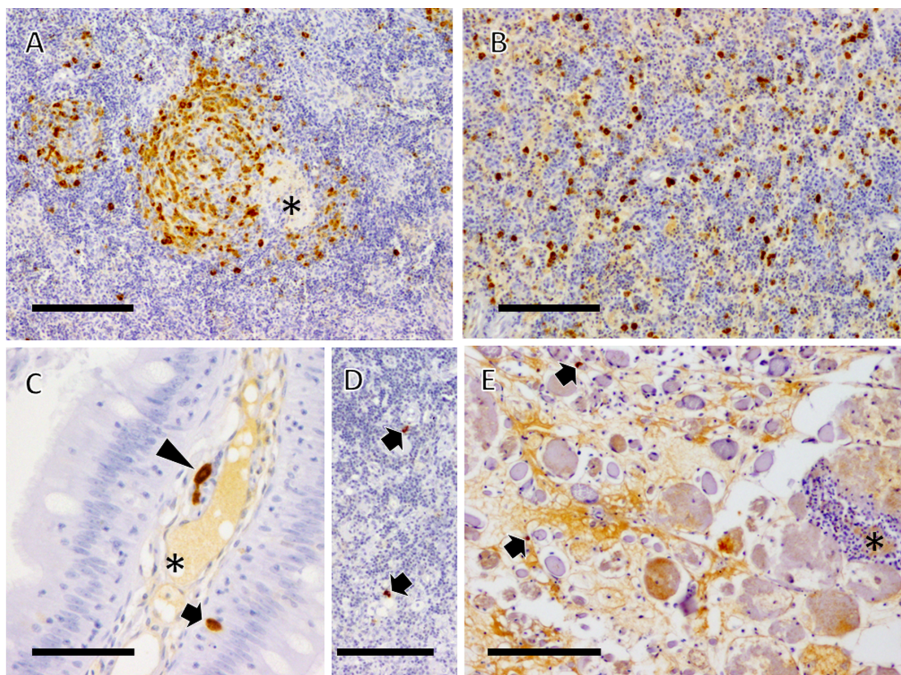
---

**Figure 5.** Immunohistochemistry for anti-turbot IgM. Differences in the number of Ig<sup>+</sup> cells between control and challenged fish in intestine (A and B) at 48 hpi and thymus (C and D) at 7 dpi. Bar 100  $\mu$ m.

---

#### 8.3.5.5. *Skin*

In challenged fish, Ig<sup>+</sup> cells were scarce and displayed morphologic features compatible with lymphocytes and plasma cells located between the damaged muscle fibers (Figure 6 E).



---

**Figure 6.** Immunohistochemistry for anti-turbot IgM from challenged fish. **A.** Spleen with Ig<sup>+</sup> cells located around and inside the MMC (asterisk) and also in the parenchyma. Bar 100  $\mu$ m. **B.** Kidney showed Ig<sup>+</sup> cells randomly distributed in the interstitial tissue. Bar 200  $\mu$ m. **C.** Intestine with Ig<sup>+</sup> cells located in the lamina propria submucosa (arrowhead) and intraepithelial (arrow). Notice the immunostaining of the serum in the vessel (asterisk). Bar 50  $\mu$ m. **D.** Thymus with Ig<sup>+</sup> cells (arrows) scattered between the interstitial tissues. Bar 100  $\mu$ m. **E.** Skin showing severe necrosis and inflammatory response (asterisk) with Ig<sup>+</sup> cells (arrows) and a strong immunostaining in the interstitial liquid. Bar 100  $\mu$ m.

---

#### **8.4. DISCUSSION**

Fish possess several mechanisms to resist bacterial diseases, however pathogenic bacteria have evolved means of avoiding many of these mechanisms (Ellis 2001). For this reason, to enhance the effect of fish defence mechanisms it is necessary to know how these mechanisms behave against infection.

The main objective of this work was to study the number and distribution of Ig<sup>+</sup> cells by IHC methods, in order to assess the kinetics of these cells and gain insight into the pathogenesis of the tenacibaculosis.

The use of anti-turbot IgM antibody revealed the occurrence of various types of Ig<sup>+</sup> cells in spleen, kidney, intestine and thymus from challenged and control fish. Among Ig<sup>+</sup> cells, B-lymphocytes and plasma cells were identified and showed the typical morphology and pattern of immunostaining of these cell types in fish (Imagawa et al. 1991, Fournier-Betz et al. 2000, Tokuda et al. 2000, Bermúdez et al. 2006). A few Ig<sup>+</sup> cells exhibiting morphological features of macrophages were also detected. The existence of Ig-immunoreactive macrophages has already been reported in fish, probably due to their Ig-binding ability and/or to phagocytosis of Ig<sup>+</sup> cells (Rombout et al. 1989, Imagawa et al. 1991, Koumans-van Diepen et al. 1994, Romano et al. 1997, Bermúdez et al. 2006). Few cells morphologically similar to Mott cells have already been described in fish by Haugarvoll et al. (2010) and Bermúdez et al. (2006) as unidentified Ig<sup>+</sup> cells.

Quantification of Ig<sup>+</sup> cells present in spleen, kidney and intestine of challenged and control fish provided data that support a significant role of these organs in the development of an immune response of turbot against the infection by *T. maritimum*. In our study, the number of Ig<sup>+</sup> cells increased in spleen, showed statistically significant differences between challenged and control fish early at 6 hpi, a finding that may be associated with the initiation of a humoral immune response in the spleen (Bermúdez et al. 2006, Grove et al. 2006). However, in kidney

at 48 hpi the number of Ig<sup>+</sup> cells in challenged fish showed statistically significant differences with regard to control fish. In this connection, Falk et al. (1995) observed that the earliest changes associated with infectious salmon anaemia in Atlantic salmon occurred in leukocyte populations of the spleen, rather than in those of the head kidney. Besides, the total number of Ig<sup>+</sup> cells was higher in the spleen than in the kidney, similar to that described by other authors in puffer fish, flounder, rohu and snakehead (Miyadai et al. 2004, Li et al. 2007, Rathore et al. 2008, Sood et al. 2010). The late increase of kidney Ig<sup>+</sup> cells as well as their lower number when compared with spleen, suggest a delayed immune response in kidney, as was reported for other turbot diseases (Bermúdez 2006).

In the current study, the number of Ig<sup>+</sup> cells in the intestine in the challenged group was significantly higher at 48 hpi comparing to control. This increase may be due to both mucosal and systemic responses induced by inoculation (Salinas et al. 2011).

In thymus, no significant differences were observed between challenged and control fish throughout the experiment but a peak at 7 dpi was detected. This finding might be related to the migration of the circulating pool of mature B-lymphocytes, as was described in mammals, which in a small proportion moving into and out of the thymus (Zapata 1996). Although in the present experiment, the thymus does not seem to play a significant role in the adaptive immune response against tenacibaculosis, studies on the number and distribution of T lymphocytes would be necessary to ascertain the real function of this organ in the disease.

Even though the skin have significant protective and immunological functions in fish (Grøntvedt and Espelid 2003, Salinas 2011), the amount of Ig<sup>+</sup> cells in the skin of control fish was low in accordance with previous reports in turbot (Feng et al. 2009). However, a greater number of Ig<sup>+</sup> cells jointly with a strong immunoreactivity in the interstitial liquid in the injured cutaneous areas were detected. The slight immunostaining detected in the serum within the vessels of some control turbot may be attributed to the variables levels of circulating antibodies released in the serum, called natural antibodies (Kachamakova et al. 2006). Correlated with this, the stronger positivity in the serum of challenged fish would be due to the increase in the number of circulating Ig<sup>+</sup> cells that release immunoglobulins in the vessels. In fact Bandín et al. (1997) described that probably serum antibody levels have a direct correlation with the increase of Ig<sup>+</sup> cells. According with this, in the current study the increase in the number of Ig<sup>+</sup> cells in the haematopoietic organs along with the raise of the circulating lymphocytes, suggest that expansion of Ig<sup>+</sup> cells occurs in the spleen and kidney and thereafter these cells migrate throughout the bloodstream infiltrating the skin lesions, where the immunoglobulins are released.

Regarding the localisation of Ig<sup>+</sup> cells, in our study were clearly observed in the parenchyma of spleen, kidney and thymus as well as within epithelium, lamina propria submucosa and tunica muscularis of the intestine, with similar distribution to those reported by other authors (Press et al. 1994, Falk et al. 1995, Bermúdez et al. 2006 Grove et al. 2006, Salinas et al. 2011). In challenged fish, a large number of Ig<sup>+</sup> cells were located surrounding and even within MMCs as well as

around blood vessels in the spleen, mainly from 24 and 48 hpi to the final of experiment. These observations are in accordance with other authors (Bermúdez et al. 2006) who found a close association of Ig+ cells with MMCs in spleen that may also be ascribed to the initiation of a humoral immune response against the pathogen, since MMCs seem to act as primitive germinal centres in fish (Lamers and De Haas 1985, Press and Evensen 1999, Bermúdez et al. 2006, Vigliano et al. 2006, Bermúdez et al. 2010). In kidney of challenged fish, although a slight tendency towards clustering of Ig+ cells was seen, a clear association of Ig+ cells with MMCs was not detected (Imagawa et al. 1991, Falk et al. 1995, Bermúdez et al. 2006). This lack of association, together with the different kinetics of Ig+ cells between spleen and kidney from challenged fish, supports the hypothesis that these organs play different roles in the fish immune system (Falk et al. 1995, Tokuda et al. 2000, Bermúdez et al. 2006). In line with this, Irwin and Kaatari (1986) demonstrated that anterior kidney lymphocytes possessed a much more restricted profile of antibody specificities with regard to spleen lymphocytes.

In our study, quantification of peripheral blood leukocytes and haematocrit determination were performed throughout experimental subcutaneous infection of turbot with *T. maritimum*. The main findings consisted in primary blood disorders of acute bacterial infection such as granulocytosis, lymphopenia and thrombocytopenia as well as a mild decrease of haematocrit.

Few studies have been addressed to evaluate quantification of peripheral blood leukocyte in infected fish. In mammals, changes in the

numbers of peripheral blood leukocytes have been associated with different diseases. In fish, the increase in the number of granulocytes has been related with the response of the fish to the bacterial infection (Ranzani-Paiva et al. 2004). Besides, variation in the number of circulating leukocytes were noticed by Sitjà-Bobadilla et al. (2006) in turbot challenged with *Enteromyxum scophthalmi*. These authors have attributed such variations to the proliferation and posterior migration of leukocytes to injured areas. In the present work, an evident increase in the number of both lymphocytes and granulocytes could be observed.

Although the significance of haematocrit value as indicator of fish sanitary status has been questioned (Houston 1997), it is considered as a simple, non-specific overall indicator of fish health (Cazenave 2005), and it has been included as an informative index in cultured rainbow trout (Řehulka et al. 2004, Ronza et al. 2011). Haematocrit values in fish with bacterial infections is controversial since in some experiments this value decrease whereas in others it did not change or even it was increase (Barham et al. 1980, Byrne et al. 1995, Aydin et al. 1997, Iwama et al. 1986, Yildiz 1998). The decrease in the haematocrit value has been associated with destruction of the erythrocytes by the bacteria or by haemorrhages in any organ of the fish (Harikrishnan et al. 2003). In the current study, the haematocrit value was lower in the challenged group, although no statistical differences could be observed. These differences may be associated to the production of hemolysins that lyse the erythrocytes. In fact, in previous studies have been proved that *T. maritimum* produce active hemolysins that are able to lyse erythrocytes of turbot, trout, salmon, ram and chicken (Pazos 1997) and

the injection of purified hemolysins from ECP caused high mortalities (Baxa et al. 1988)

In summary, the variations in the number of leukocytes in the peripheral blood along with the kinetics and distribution of Ig<sup>+</sup> cells in spleen, kidney, thymus, intestine and skin from turbot challenged with *T. maritimum*, suggest that this bacterium triggers a humoral immune response in turbot. Therefore, experimentally induced tenacibaculosis provokes the synthesis of specific antibodies by Ig<sup>+</sup> cells in spleen and kidney that lately migrate to the lesional areas of skin where immunoglobulins are released. In addition, study of hematological parameters of turbot challenged with *T. maritimum* showed characteristic but non-specific changes of white blood cells. Therefore, the hematology may be a useful tool to assess the immune status of fish, as well as contribute to the general knowledge of the response raised against the disease.

## **8.5. REFERENCES**

Álvarez-Pellitero P (2008). Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 126:171-198.

Avendaño-Herrera R, Núñez S, Barja JL, Toranzo AE (2008). Evolution of drug resistance and minimum inhibitory concentration to enrofloxacin in *Tenacibaculum maritimum* strains isolated in fish farms. *Aquaculture International* 16:1-11.

Aydin S, Celebi S, Akyurt I (1997). Clinical, haematological and pathological investigations of *Escherichia vulneris* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Pathology* 32:29-34.

Bandín I, Dopazo CP, Van Muiswinkel WB, Wiegertjes GF (1997). Quantitation of antibody secreting cells in high and low antibody responder inbred carp (*Cyprinus carpio* L.) strains. *Fish and Shellfish Immunology* 7:487-501.

Barham WT, Smit GL, Schoonbee HJ (1980). The haematological assessment of bacterial infection in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology* 17:275-281.

Baxa DV, Kawai K, Kusuda R (1988). *In vitro* and *in vivo* activities of *Flexibacter maritimus* toxins. *Bulletin of Marine Sciences and Fisheries, Kochi University* 10:1-8.

Bermúdez R, Vigliano F, Marcaccini A, Sitjà-Bobadilla A, Quiroga MI, Nieto JM (2006). Response of Ig-positive cells to *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) experimental infection in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.): a histopathological and immunohistochemical study. *Fish and Shellfish Immunology* 21:501-512.

Bermúdez R, Losada AP, Vázquez S, Redondo MJ, Álvarez-Pellitero P, Quiroga MI (2010). Light and electron microscopic studies on turbot *Psetta maxima* inoculated with *Enteromyxum scophthalmi*: histopathology of turbot enteromyxosis. *Diseases of Aquatic Organisms* 89:209-221.

Boes M, Prodeus AP, Schmidt T, Carroll MC, Chen J (1998). A critical role of natural immunoglobulin M in immediate defense against systemic bacterial infection. *The Journal of Experimental Medicine* 188:2381-2386.

Boes M (2000). Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Molecular Immunology* 37:1141-1149.

Byrne PJ, Ostland VE, Lumsden JS, MacPhee DD, Ferguson HW (1995). Blood chemistry and acid-base balance in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* with experimentally-induced acute bacterial gill disease. *Fish Physiology and Biochemistry* 14:509-518.

Cazenave J, Wunderlin DA, Hued AC, Bistoni MA (2005). Haematological parameters in a neotropical fish, *Corydoras paleatus* (Jenyns, 1842) (Pisces, Callichthyidae), captured from pristine and polluted water. *Hidrobiologia* 537:25-33.

Cuesta A, Meseguer J, Esteban MA (2004). Total serum immunoglobulin M levels are affected by immunomodulators in seabream (*Sparus aurata* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 101:203-210.

El Morabit A, Carballás CG, Seoane R, Riaza A, Santos Y (2006). Flow cytometric study of phagocytic and oxidative burst activity of turbot head-kidney leucocytes in response to *Aeromonas salmonicida* and *Tenacibaculum maritimum*. *Recent Research Developments Microbiology*. 10:133-143.

Ellis AE (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology* 25:827-839.

Falk K, Press CM, Landsverk T, Dannevig BH (1995). Spleen and kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) show histochemical changes early in the course of experimentally induced infectious salmon anaemia (ISA). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 49:115-126.

Feng SM, Zhan WB, Sheng XZ, Yang K, Han JG, Wei JL, Li J, Qiao XT (2009). Response of mucosal and systemic sIgM-positive cells in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) immunization with *Edwardsiella tarda*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 129:108-114.

Fournier-Betz V, Quentel C, Lamour F, Leven A (2000). Immunocytochemical detection of Ig-positive cells in blood, lymphoid organs and the gut associated lymphoid tissue of the turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish and Shellfish Immunology* 10:187-202.

García-Lamas N, García-González P, Fuentes-Edfuf C, Domínguez-Merelles B, Faílde LD, Ruiz de Ocenda M, Seoane R, Santos Y (2010). Estudio de la respuesta inmune no específica en rodaballos infectados con *Tenacibaculum maritimum*. *Foro de los Recursos Marinos y de la Acuicultura de las Rías Gallegas* 12:463-469.

Grøntvedt RN, Espelid S (2003). Immunoglobulin producing cells in the spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen): localization in adults and during juvenile development. *Developmental and Comparative Immunology* 27:569-578.

Grove S, Johansen R, Jorun Reitan L, Press CML (2006). Immune-and enzyme histochemical characterisation of leukocyte populations within lymphoid and mucosal tissues of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Fish and Shellfish Immunology. 20:693-708.

Haugarvoll E, Bjerkas I, Szabo NJ, Satoh M, Koppang EO (2010). Manifestations of systemic autoimmunity in vaccinated salmon. Vaccine 28:4961-4969.

Harikrishnan R, Nisha Rani M, Balasundaram C (2003). Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. Aquaculture 221:41-50.

Houston AH (1997). Review: are the classical hematological variables acceptable indicators of fish health? Transactions of the American Fisheries Society 126:879-894.

Imagawa T, Hashimoto Y, Kon Y, Sugimura M (1991). Immunoglobulin containing cells in the head kidney of carp (*Cyprinus carpio* L.) after bovine serum albumin injection. Fish and Shellfish Immunology 1:173-185.

Irwin MJ, Kaattari SL (1986). Salmonid B lymphocytes demonstrate organ dependent functional heterogeneity. Veterinary Immunology and Immunopathology 12:39-45.

Iwama GK, Greek GL, Randall DJ (1986). Changes in selected haematological parameters in juvenile chinook salmon subjected to a bacterial challenge and a toxicant. Journal of Fish Biology 28:563-572.

Iwama G, Nakanishi T (1996). The fish immune system: organism, pathogen, and environment. Ed: Iwama G, Nakanishi T. Academic Press, San Diego, California.

Kachamakova NM, Irnazarow I, Parmentier HK, Savelkoul HFJ, Pilarczyk A, Wiegertjes GF (2006). Genetic differences in natural antibody levels in common carp (*Cyprinus carpio* L.). Fish and Shellfish Immunology 21:404-413.

Koumans-van Diepen JE, van de Lisdonk MHM, Taverne-Thiele AJ, Verburg-van Kemenade BML, Rombout JHWM (1994). Characterisation of immunoglobulin-

binding leucocytes in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Developmental and Comparative Immunology* 18:45-56.

Lamers CH, De Haas MJ (1985). Antigen localization in the lymphoid organs of carp (*Cyprinus carpio*). *Cell and Tissue Research* 242:491-498.

Li Q, Zhan W, Xing J, Sheng X (2007). Production, characterisation and applicability of monoclonal antibodies to immunoglobulin of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish and Shellfish Immunology* 23:982-990.

Magnadottir B (2010). Immunological control of fish diseases. *Marine Biotechnology* 12:361-379.

Miyadai T, Ootani M, Tahara D, Aoki M, Saitoh K (2004). Monoclonal antibodies recognising serum immunoglobulins and surface immunoglobulin-positive cells of puffer fish, torafugu (*Takifugu rubripes*). *Fish and Shellfish Immunology* 17:211-222.

Pazos F (1997). "Flexibacter maritimus": estudio fenotípico, inmunológico y molecular. Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain.

Press CM, Dannevig BH, Landsverk T (1994). Immune and enzyme histochemical phenotypes of lymphoid and nonlymphoid cells within the spleen and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish and Shellfish Immunology* 4:79-93.

Press CM, Evensen Ø (1999). The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish and Shellfish Immunology* 9:309-318.

Quentel C, Obach A (1992). The cellular composition of the blood and haematopoietic organs of turbot *Scophthalmus maximus* L. *Journal Fish Biology* 41:709-716.

Ranzani-Paiva MJT, Ishikawa CM, Eiras AC, Silveira VR (2004). Effects of an experimental challenge with *Mycobacterium marinum* on the blood parameters of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 47:945-953.

Rathore G, Kumar G, Sood N, Kapoor D, Lakra WS (2008). Development of monoclonal antibodies to rohu (*Labeo rohita*) immunoglobulins for use in immunoassays. *Fish and Shellfish Immunology* 25:761-774.

Řehulka J, Minařík B, Řehulková E (2004). Red blood cell indices of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in aquaculture. *Aquaculture Research* 35:529-546.

Romano N, Taverne-Thiele JJ, Van Maanen JC, Rombout JHMW (1997). Leucocyte subpopulations in developing carp (*Cyprinus carpio* L.): immunocytochemical studies. *Fish and Shellfish Immunology* 7:439-453.

Rombout JHWM, Bot HE, Taverne-Thiele JJ (1989). Immunological importance of the second gut segment of carp. I. Uptake and processing of antigens by epithelial cells and macrophages. *Journal of Fish Biology* 35:167-178.

Ronza P, Bermúdez R, Losada AP, Robles A, Quiroga MI (2011). Mucosal CD3 $\epsilon$ + cell proliferation and gut epithelial apoptosis: implications in rainbow trout gastroenteritis (RTGE). *Journal of Fish Diseases* 34:433-443.

Salinas I, Zhang YA, Sunyer JO (2011). Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Developmental and Comparative Immunology* 35:1346-1365.

Santos Y, Pazos F, Barja JL (1999). *Flexibacter maritimus*, causal agent of flexibacteriosis in marine fish. In: ICES identification leaflets for diseases and parasites of fish and shellfish. Ed: Oliver G. International Council for the Exploration of the Sea, Copenhagen, Denmark 55:1-6.

Sitjà-Bobadilla A, Redondo MJ, Bermúdez R, Palenzuela O, Ferreiro I, Riaza A, Quiroga I, Nieto JM, Álvarez-Pellitero P (2006). Innate and adaptive immune responses of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), following experimental infection with *Enteromyxum scophthalmi* (Myxosporea: Myxozoa). *Fish and Shellfish Immunology* 21:485-500.

Sood N, Chaudhary DK, Rathore G, Singh A, Lakra WS (2010). Monoclonal antibodies to snakehead, *Channa striata* immunoglobulins: Detection and quantification of immunoglobulin-positive cells in blood and lymphoid organs. *Fish and Shellfish Immunology* 30:569-575.

Tokuda Y, Toyohara H, Ikemoto M, Kina T, Sakaguchi M (2000). Distribution of immunoglobulin-positive cells in the spleen and kidney of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science* 66:1082-1086

Vigliano FA, Bermúdez R, Quiroga MI, Nieto JM (2006). Evidence for melanomacrophage centres of teleost as evolutionary precursors of germinal centres of higher vertebrates: an immunohistochemical study. *Fish and Shellfish Immunology* 21:467-471.

Yildiz HY (1998). Effects of experimental infection with *Pseudomonas fluorescens* on different blood parameters in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* 50:82-85.

Zaccone R, Mancuso M (2008). First report on antibody response of *Seriola dumerilii* (Risso 1810) challenged with *Listonella anguillarum*. *Fish and Shellfish Immunology* 25:689-692.

Zapata AG, Chiba A, Varas A (1996). Cells and tissues of the immune system of fish. In: *The fish immune system: Organism, Pathogen and environment*. Ed: Iwama G, Nakanishi T. Academic Press, pp 1-62.

**CAPÍTULO 9.**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN GENERAL**



En la presente memoria de Tesis Doctoral se aborda en profundidad el estudio de la tenacibaculosis en lenguado y rodaballo, describiendo el cuadro lesional y estableciendo los criterios para su diagnóstico anatomopatológico. Además, se aportan datos novedosos sobre la interacción patógeno-hospedador (vía de entrada, distribución sistémica, reservorios y respuesta inmunitaria), que permitirán en el futuro reducir o eliminar el impacto de esta enfermedad en la acuicultura marina.

Galicia es una potencia mundial en acuicultura marina y líder en la producción de rodaballo (APROMAR 2011). Además, en nuestra Comunidad Autónoma el lenguado (*Solea senegalensis*) se encuentra actualmente en vías de consolidación a nivel industrial, principalmente por la apuesta empresarial de las empresas productoras de rodaballo. Sin embargo, todavía es preciso mejorar los resultados económicos en la crianza intensiva del lenguado para conseguir los logros obtenidos en el rodaballo. En este sentido, la experiencia de los últimos años demuestra que su cultivo ha encontrado en las patologías un grave factor limitante que, en gran medida, está frenando las expectativas iniciales (Padrós y col. 2003). Uno de los principales problemas patológicos en esta especie es una enfermedad ulcerativa, presente tanto en etapa juvenil como en engorde y que se ha asociado a infecciones causadas por la bacteria *Tenacibaculum maritimum* sola o en combinación con diferentes especies de los Géneros *Vibrio* y *Listonella* (Padrós y col. 2003, Santos 2005). En Galicia *Vibrio* spp se detectan generalmente en infecciones mixtas con *T. maritimum* aunque, en otras áreas geográficas

también pueden hallarse como patógenos primarios, por lo que la etiopatogenia del problema no ha sido todavía esclarecida (Padrós y col. 2003).

Entre los años 2003 al 2005 se detectaron en granjas de lenguado senegalés en Galicia varios brotes de esta enfermedad ulcerativa cutánea en peces procedentes de diferentes lotes (Capítulos 5 y 6). En el presente estudio se ha realizado una descripción pormenorizada de las lesiones macroscópicas e histológicas de esta enfermedad ulcerativa del lenguado, lo que ha permitido establecer los criterios para el diagnóstico anatomopatológico de dos formas de presentación clínica: **crónica** (Capítulo 5) y **septicémica** (Capítulo 6). Además se ha establecido la participación de *T. maritimum* como patógeno en el desarrollo de ambos cuadros morfológicos (Capítulos 5 y 6) y la similitud de esta enfermedad ulcerativa con la tenacibaculosis causada por este microorganismo en el rodaballo (Capítulo 7).

La **forma crónica** se presentó principalmente en lotes de engorde que mostraban una elevada morbilidad (20%) y baja mortalidad (0,1%) por mes (Capítulo 5). Los ejemplares afectados mostraban úlceras cutáneas severas, localizadas fundamentalmente en la parte central de las aletas dorsal y ventral mostrando ocasionalmente despigmentación. Las lesiones presentaban forma triangular o en cuña, con una amplia base proyectada hacia la epidermis, y un estrecho vértice alcanzando las capas musculares, apareciendo cubiertas por un colgajo necrótico de epidermis, quedando las espinas expuestas y considerablemente acortadas.

El estudio histológico confirmó que los ejemplares estudiados solamente presentaban lesiones cutáneas, consistentes en úlceras severas, caracterizadas por pérdida total de epidermis y dermis, con necrosis de paquetes musculares e incluso hueso, y presencia de un infiltrado inflamatorio asociado de leve a moderado, con predominio de macrófagos. En la periferia de las úlceras, los bolsillos escamosos aparecían sin escamas y rellenos de un exudado con abundantes células inflamatorias en su interior. Los melanóforos se encontraban agregados, y algunos de ellos degenerados, observándose pigmentos de melanina dispersos por la dermis. Esta agregación y destrucción de los melanóforos podría explicar el aspecto macroscópico blanquecino de las lesiones cutáneas observadas en los peces afectados por tenacibaculosis, como ha sido descrito en enfermedades cutáneas que afectan a otras especies de peces (Corrales y col. 2009).

La utilización de la técnica de tinción de Gram permitió constatar la presencia de gran cantidad de bacterias filamentosas Gram negativas asociadas a las lesiones ulcerativas. El aislamiento bacteriológico y la técnica PCR confirmaron la presencia de *T. maritimum* como la única especie bacteriana presente en las lesiones externas de todos los peces afectados.

A diferencia de otras enfermedades de la piel que cursan con un alto número de úlceras distribuidos en cualquier región del pez (Wiklund y Bylund 1993, Roberts 2001, Austin y Austin 2007, Bruno y col. 2007, Kodama y col. 2007), en el presente estudio no se apreciaron más de 2-3 lesiones ulcerativas graves en un

mismo lenguado, ubicadas principalmente en las aletas. Estos hallazgos coincidían con la forma crónica de la tenacibaculosis descrita en salmónidos (van Gelderen y col. 2011). Por otra parte, siguiendo los criterios de Law (2001) para el diagnóstico diferencial de lesiones ulcerativas en peces, la forma de cuña de las úlceras observadas en este estudio indicaría que las lesiones comenzaban en la superficie de la piel y progresaban a las capas más profundas de la dermis, lo que se conoce como lesiones “de fuera a adentro”.

Un hallazgo interesante del presente trabajo fue la observación, mediante microscopía electrónica de barrido, de que la erosión y ulceración de la epidermis comenzaba en la zona central de las escamas. Éstas aparecían expuestas y recubiertas de gran número de bacterias filamentosas, situadas en su superficie y entre los radios de las mismas. Las escamas, un componente dérmico de los peces teleósteos, representan una fuente fácilmente disponible de calcio, elemento necesario para el crecimiento de flavobacterias (Hikida y col. 1979). Este hecho podría revelar que *T. maritimum* se adhiere a la superficie de las escamas donde puede utilizar todos los nutrientes necesarios (calcio, proteínas...) para sobrevivir y/o proliferar.

*T. maritimum* es la bacteria responsable de una enfermedad de distribución mundial, la tenacibaculosis o flexibacteriosis marina, considerada como uno de los problemas patológicos más graves en especies de cultivo marino. La enfermedad afecta a un amplio rango de especies piscícolas de valor comercial y ocasiona

elevadas pérdidas económicas, por su alta morbilidad y mortalidad (Santos 2005, Salati y col. 2005, Toranzo y col. 2005, Austin y Austin 2007, van Gelderen y col. 2011).

Tradicionalmente, su diagnóstico se basa en el aislamiento de la bacteria en medios de cultivo específicos y su identificación mediante métodos microbiológicos y la confirmación del diagnóstico mediante métodos serológicos y moleculares como la PCR (Avendaño-Herrera y col. 2006a, Santos y col. 1999, Toranzo y col. 2005). Sin embargo, estos métodos no permiten diagnosticar la enfermedad en las fases tempranas ni la diferenciación entre colonización e invasión de los tejidos. Además, en numerosas ocasiones se aísla más de una especie bacteriana debido a infecciones mixtas o secundarias, por lo que resulta difícil determinar cual es el agente etiológico primario (Noga 2000, Law 2001).

Las técnicas inmunohistoquímicas (IHQ) resultan de gran interés en el diagnóstico de numerosas enfermedades, sobre todo, cuando los microorganismos son difíciles de cultivar y/o identificar debido a sus requerimientos nutricionales o porque presentan una morfología atípica (Eyzaguirre y Haque 2008, Ramos-Vara y col. 2008). Además, la IHQ permite la co-localización del agente etiológico con la lesión que provoca, aportando una mayor precisión diagnóstica y una mejor comprensión de la patogenia de las enfermedades (Ramos-Vara y col. 2008, Dagleish y col. 2010).

En el presente trabajo el empleo de la técnica IHQ supuso una herramienta fundamental para determinar la vía de entrada, distribución sistémica y posibles reservorios de *T. maritimum*, así como para demostrar la implicación de esta bacteria en el desarrollo del cuadro lesional de la tenacibaculosis marina del lenguado (Capítulo 6) y del rodaballo (Capítulo 7).

La primera fase del trabajo consistió en la puesta a punto de la técnica IHQ para el diagnóstico de la tenacibaculosis. Con este fin, se obtuvo y se purificó mediante métodos cromatográficos un anticuerpo policlonal anti-*T. maritimum*. A continuación, se realizaron infecciones experimentales de lenguado senegalés, utilizando una cepa de *T. maritimum* aislada durante un brote natural y empleando la vía de inoculación subcutánea. El propósito de esta experiencia fue doble, por una parte, obtener los tejidos necesarios para su empleo como controles positivos en los ensayos de puesta a punto de la técnica de IHQ, por otro parte, esclarecer la ruta de infección y la participación de *T. maritimum* en el desarrollo de la enfermedad ulcerativa del lenguado. Finalmente, se determinó la efectividad para el diagnóstico de la técnica IHQ, utilizando cortes histológicos de muestras obtenidas a partir de lenguados procedentes de brotes epizoóticos.

La técnica de IHQ, empleando el anticuerpo anti-*T. maritimum* sobre muestras de úlceras cutáneas y de órganos internos, presentó un claro resultado positivo tanto en los lenguados infectados de manera natural como experimental, permitiendo demostrar que la bacteria actúa como patógeno primario en la

enfermedad ulcerativa del lenguado descrita en el presente estudio (Capítulo 6).

La puerta de entrada de *T. maritimum* en los tejidos del hospedador no había sido esclarecida hasta el momento (Avendaño-Herrera y col. 2006b), si bien trabajos previos habían sugerido que la piel es un órgano diana y una vía probable de infección (Magariños y col. 1995). En el presente trabajo, las características morfológicas de las lesiones ulcerativas de la piel en los peces infectados de forma natural con *T. maritimum*, y su asociación con la detección del antígeno y el aislamiento bacteriano, indica que la puerta de entrada de la bacteria sería la piel (Capítulos 5 y 6). Los resultados obtenidos en los peces infectados de manera experimental corroboraron estos hallazgos (Capítulo 6).

Algunos autores han sugerido que el daño en la superficie de la piel, particularmente en las partes en constante movimiento o en zonas de abrasión, podría facilitar la colonización del epitelio por *T. maritimum* y su posterior penetración a los tejidos subepiteliales (van Gelderen y col. 2011). El hecho de que las lesiones en el lenguado se localicen fundamentalmente en las aletas dorsal y ventral, podría estar relacionado con microtraumatismos a ese nivel ocasionados por el tipo de natación de esta especie, basado en movimientos ondulatorios del cuerpo.

Por otro lado, se ha sugerido que *T. maritimum* es capaz de propagarse a los órganos internos y producir una septicemia (Bernardet 1998). Los resultados obtenidos en el estudio morfológico junto con la detección del antígeno bacteriano en las lesiones de piel, órganos internos y vasos sanguíneos, demuestran que una vez que las bacterias penetran en la piel, llegan al torrente sanguíneo y causan una infección sistémica en el animal. Estos hallazgos indican que esta bacteria puede ocasionar una **forma septicémica**, coincidiendo con lo descrito en otras enfermedades bacterianas responsables de cuadros septicémicos en peces teleósteos (Ferguson 2006, Hagiwara y col. 2009, Bjelland y col. 2012). Las lesiones inespecíficas encontradas en algunos ejemplares consistentes en petequias y hemorragias en la base de las aletas y órganos internos y microtrombos, son indicativas de coagulación intravascular diseminada, y contribuyen a explicar dicha hipótesis.

Hasta la fecha, sólo el moco que cubre la superficie del pez había sido propuesto como un reservorio de *T. maritimum* (Magariños y col. 1995, Avendaño-Herrera y col. 2005). Sin embargo, en el presente estudio, los antígenos de *T. maritimum* se detectaron en el lumen gastrointestinal intacto de los lenguados que presentaron tenacibaculosis de forma natural (Capítulo 6). Este hallazgo indica que el intestino es un posible reservorio para las bacterias. Esta hipótesis está de acuerdo con estudios recientes realizados en salmones infectados con *Vibrio salmonicida*. En dicho trabajo se demostró que *V. salmonicida* puede colonizar el intestino después de una infección sistémica, convirtiéndose los animales

afectados en portadores y, por tanto, en una fuente de liberación del patógeno al medio ambiente, aumentando así la presión de la infección en la población (Bjelland y col. 2012).

Los estudios previos realizados para la detección mediante técnicas IHQ de *T. maritimum* solamente se habían empleado sobre restos necróticos de lesiones ulcerativas en salmónidos (van Gelderen y col. 2011). La técnica IHQ desarrollada en el presente estudio supone un importante avance en el diagnóstico de la tenacibaculosis marina a partir de muestras fijadas en formol o líquido de Bouin e incluidas en parafina (Capítulos 6 y 7).

La tenacibaculosis se ha convertido en los últimos años en una enfermedad emergente que está limitando, en gran medida, el cultivo de nuevas especies marinas, como hemos podido comprobar en el caso del lenguado. A pesar de ello, su patogenia no ha sido todavía esclarecida. Los modelos experimentales suponen en la actualidad una de las mejores herramientas para dilucidar la interacción bacteria-hospedador, información que resulta imprescindible para establecer las medidas de profilaxis, control y tratamiento adecuadas.

Hasta el momento se han evaluado diferentes vías de inoculación con el fin de reproducir experimentalmente la tenacibaculosis, pero los resultados obtenidos han sido muy variables. Así, Wakabayashi y col. (1984) y Baxa y col. (1987) demostraron que la infección por baño no era un método fiable de inducción de la enfermedad, a menos que la piel se escarificara previamente

(Bernardet y col. 1994). Sin embargo, otros autores han logrado reproducir la enfermedad utilizando como método de infección la inmersión prolongada de los peces en la suspensión bacteriana (Avendaño-Herrera y col. 2006b) o empleando altas dosis de inóculo (van Gelderen y col. 2011). Otros autores no han podido reproducir la enfermedad mediante inoculación experimental por vía intramuscular e intraperitoneal (Wakabayashi y col. 1984, Alsina y Blanch 1993, Pepín y Emery 1993, Avendaño-Herrera y col. 2006b).

Dada la importancia sanitaria y económica de la tenacibaculosis en el rodaballo y la escasez de modelos experimentales efectivos en esta especie, se diseñó una experiencia para establecer la ruta de infección más adecuada que permitiese profundizar en el conocimiento de su patogenia y de la respuesta inmunitaria frente a la infección (Capítulos 7 y 8). Paralelamente y para una mejor comprensión de los cambios morfológicos y de los mecanismos de respuesta de la piel, se realizó la caracterización histológica, inmunohistoquímica y ultraestructural de la piel sana, con especial énfasis en la capa pigmentaria (Capítulo 4).

El presente trabajo proporciona la primera descripción de los cambios morfopatológicos y de distribución de antígeno bacteriano en los tejidos de rodaballo infectados experimentalmente con *T. maritimum* mediante inyección subcutánea (SC) e intraperitoneal (IP), aportando datos novedosos sobre la interacción de la bacteria con el organismo (Capítulos 7 y 8). Para la inoculación SC se eligió un área

anatómica denominada seno dorsal medio, que ha sido propuesta como la vía idónea para el ensayo de estrategias de vacunación e infección (LaPatra y col. 2010, Treasurer y Cox 2008).

El cuadro histológico junto con el estudio de la distribución antigénica permitió demostrar que ambas vías pueden ocasionar la forma septicémica de la tenacibaculosis (con diferente patrón de distribución). Sin embargo, consideramos que la ruta de inoculación SC es la más adecuada para los estudios de patogenia, puesto que precisa una menor dosis infectiva, la distribución sistémica del antígeno ocurre de manera más rápida y es la única capaz de reproducir las lesiones ulcerativas características de la enfermedad. Por otro lado, los hallazgos en este experimento mostraron similitudes evidentes con la infección natural y experimental en lenguados.

No está clara la razón por la cual la distribución de *T. maritimum* se produce más rápidamente cuando se utiliza la ruta SC como vía de infección experimental. En el estudio cronológico de las muestras histológicas obtenidas a partir del área de inoculación, se ha podido observar como la inmunopositividad, fundamentalmente de células fagocíticas, pero también de bacterias libres, se extendía rápidamente desde el punto de inoculación en la hipodermis, siguiendo el soporte fibrilar de la matriz extracelular de la hipodermis y del perimio, hacia el interior de los vasos sanguíneos. El hecho de que la hipodermis esté muy bien vascularizada y la propia composición de la matriz extracelular podrían favorecer la diseminación.

Lovoll y col. (2009) describieron lesiones cutáneas similares a la “úlceras de invierno”, producida por *Moritella viscosa* en salmónidos. Estos autores apuntaron que los productos extracelulares de la bacteria podrían ser parte de una estrategia de invasión de ésta para llegar al torrente sanguíneo y producir una infección sistémica. En este sentido, se ha demostrado que *T. maritimum* posee varios factores de virulencia como toxinas y enzimas (Baxa y col. 1988, Handlinger y col. 1997, van Gelderen y col. 2009) que tienen alta actividad proteolítica (Pazos 1997) y que causan necrosis tisular en salmónidos (van Gelderen y col. 2009). Por esta razón, sugerimos que *T. maritimum* podría seguir la misma estrategia que *M. viscosa* para dañar el tejido y alcanzar los vasos.

Por otro lado, las lesiones cutáneas se caracterizaban por presentar una reacción inflamatoria con predominio de granulocitos y macrófagos. Los macrófagos no solamente responden a moléculas derivadas del patógeno sino también a moléculas endógenas como los fragmentos de la proteólisis del colágeno (Oppenheim y Yang 2005). De hecho, recientemente se ha demostrado en dorada que cuando el colágeno se degrada por la acción de proteasas, sus fragmentos son detectados por las células fagocíticas del pez (Castillo-Briceño y col. 2009). Este hallazgo explicaría que la respuesta inflamatoria fuese más intensa cuando la destrucción tisular era más evidente, y que estuviese constituida principalmente por células fagocíticas. La propia respuesta inflamatoria contribuiría al proceso patológico y

podría explicar que éste culminase en fallo multiorgánico, shock y muerte (Heumann y Roger 2002).

Por todo lo anteriormente expuesto, creemos que son necesarios estudios futuros que ayuden a esclarecer el papel de los productos extracelulares bacterianos y de las células inflamatorias y sus mediadores en el desarrollo de las úlceras cutáneas y del cuadro septicémico característicos de la tenacibaculosis.

En la tenacibaculosis que afecta a peces salmónidos se han descrito lesiones branquiales, asociadas a la presencia de abundante cantidad de bacterias (van Gelderen y col. 2010, Mitchell y Rodger 2011). En contraste, en el presente estudio no se apreciaron daños tisulares aparentes y el antígeno de *T. maritimum* sólo se observó en los vasos sanguíneos de las branquias, lo que indica que la llegada del antígeno a este órgano se produjo por vía sanguínea.

Mediante el estudio cronológico de la lesiones y de la distribución del antígeno bacteriano en los rodaballos infectados por vía IP, se observó un resultado destacable. En áreas focales de la serosa gastrointestinal, la reacción inflamatoria y la inmunodetección del antígeno de *T. maritimum* se extendía hacia la capa muscular (donde se apreciaba necrosis de las fibras musculares) y, posteriormente, llegaba a la superficie de la mucosa. En el último muestreo se detectó una intensa positividad antigénica recubriendo el epitelio intestinal. Estos datos aportan nuevas evidencias a nuestra hipótesis de que el intestino de los

peces infectados puede convertirse en un reservorio de la bacteria.

Actualmente el establecimiento de medidas profilácticas eficaces es la mejor alternativa para combatir la tenacibaculosis, puesto que su control con compuestos antimicrobianos está limitado por la rápida aparición de cepas resistentes (Avendaño-Herrera y col. 2008). En este sentido, los mecanismos implicados en la respuesta humoral específica son los que más interés suscitan para el establecimiento de las estrategias de defensa frente a las infecciones bacterianas (Iwama y Nakanishi 1996).

Generalmente, los agentes patógenos desencadenan una respuesta humoral que se caracteriza por un aumento inicial de los niveles de inmunoglobulinas (Boes 2000), específicamente inmunoglobulina M (IgM) que es un componente esencial de la respuesta humoral de los teleósteos (Cuesta y col. 2004, Zaccone y Mancuso 2008) y tiene funciones en la defensa inmediata frente a la infección bacteriana (Boes y col. 1998). Los linfocitos B y las células plasmáticas son los principales subtipos celulares implicados en la producción de inmunoglobulinas (Imagawa y col. 1991, Fournier-Betz y col. 2000, Tokuda y col. 2000, Bermúdez y col. 2006). Hasta la fecha, varios estudios han evaluado la respuesta inmune humoral de los peces por medio de diferentes técnicas, pero pocos de ellos han utilizado técnicas de IHQ para caracterizar la localización *in situ* de las células portadoras de inmunoglobulinas (Imagawa y col. 1991, Falk y col. de 1995, Bermúdez y col. 2006, Haugarvoll y col. 2010).

En nuestro trabajo hemos estudiado el número y distribución de células Ig<sup>+</sup> mediante técnicas IHQ en el grupo de rodaballos inoculados por vía SC en el seno dorsal medio (Capítulo 8).

Los resultados obtenidos en este estudio indican que la infección por *T. maritimum* en el rodaballo induce una respuesta inmune humoral que implica cambios en el número y distribución de células Ig<sup>+</sup>.

Los tres tipos celulares positivos al anticuerpo anti-IgM fueron linfocitos B, células plasmáticas y, en menor medida, macrófagos, coincidiendo con lo previamente descrito por otros investigadores en teleósteos (Rombout y col. 1989, Imagawa y col. 1991, Koumans-van Diepen y col. 1994, Fournier-Betz y col. 2000, Tokuda y col. 2000, Bermúdez y col. 2006). Además, también mostraron inmunorreacción las células Mott, un tipo celular que presenta inclusiones de inmunoglobulinas en su citoplasma, y que se sabe que representan una disfunción de las células plasmáticas (Haugarvoll y col. 2010).

Con respecto a la localización de las células Ig<sup>+</sup>, es necesario remarcar que se disponían aleatoriamente en el parénquima de los órganos hematopoyéticos. Además, estas células se detectaron en numerosas ocasiones alrededor de los centros de melanomacrófagos (CMM) en el bazo de los peces infectados. Sin embargo, esta localización no fue tan obvia en el riñón, coincidiendo con lo observado por otros autores (Press y col. 1994, Falk y col. 1995, Bermúdez y col. 2006). En el tracto

gastrointestinal, las células inmunorreactivas se disponían en la lámina propia y en menor medida en la capa muscular y el epitelio de revestimiento. Finalmente se observó una intensa inmunopositividad en las zonas de la piel con lesión, fundamentalmente del líquido de edema intersticial, pero también de células del infiltrado inflamatorio.

En cuanto al estudio cuantitativo y la cinética de células Ig<sup>+</sup>, se observó que el número fue significativamente mayor en el bazo, riñón, intestino, timo y en la piel de los animales infectados, con respecto al grupo control, siendo el bazo el primer órgano en mostrar diferencias significativas.

Estos hallazgos podrían indicar que el bazo es el primer órgano que se activa frente a la infección, como ya había sido previamente sugerido por Falk (1995). Posteriormente, el riñón, junto con el bazo, asumiría la producción de IgM coincidiendo con lo descrito por Bermúdez y col. (2006) en rodaballos infectados con *Enteromyxum scophthalmi*. En último lugar, los linfocitos serían vehiculados desde el bazo y el riñón por medio de la sangre hasta las áreas de piel lesionadas y en esas zonas se liberarían las inmunoglobulinas. El aumento en el número de células portadoras de IgM en la mucosa intestinal de los peces retados puede estar asociado con la respuesta a nivel sistémico y de mucosas que se desencadena durante la infección sistémica (Salinas y col. 2011).

Finalmente, es bien sabido que en los mamíferos, los parámetros hematológicos son una herramienta imprescindible para el diagnóstico de las enfermedades. A pesar de ello, son muy pocos los estudios en peces que incluyan estas técnicas (Clauss y col. 2008). Por ello, consideramos que es necesario establecer valores hematológicos de referencia para las especies de interés comercial y el análisis de su variación durante el desarrollo de los procesos infecciosos. Esta información proporciona, por un lado, datos sobre el estado inmunitario de los peces (lo que puede tener un gran interés, por ejemplo, previamente a su vacunación o manipulación) y, por otro lado, un mejor entendimiento de la respuesta frente a la enfermedad.

En este trabajo se ha realizado un seguimiento de los cambios cuantitativos en la serie blanca y en el valor hematocrito en muestras de sangre de rodaballos inoculados por vía SC en el seno dorsal medio con *T. maritimum* en comparación con el grupo control (Capítulo 8).

Los principales hallazgos consistieron en cambios en la serie blanca, descritos también como característicos en infecciones bacterianas agudas en mamíferos, como son granulocitosis, linfopenia, trombocitopenia, y un leve descenso en el hematocrito.

Debido a la heterogeneidad morfológica entre especies, y a la falta de marcadores específicos de la superficie celular, se desconoce el papel de los granulocitos de peces frente a las

infecciones bacterianas, aunque se ha sugerido que pueden realizar funciones equivalentes a los neutrófilos de los mamíferos (Chaves-Pozo y col. 2004). En nuestro trabajo, el porcentaje de granulocitos de los rodaballos infectados mostró diferencias significativas con los grupos control en todos los muestreos, pero especialmente a las 24 h, donde se observó un claro incremento. Esto demuestra que los granulocitos, al igual que los neutrófilos, son las células que primero responden frente a la infección, con una movilización hacia el foco lesional. La granulocitosis se ha observado en asociación con procesos inflamatorios en teleósteos y en peces cartilaginosos (Clauss y col. 2008, Savari y col. 2011).

Al comienzo del experimento, el porcentaje de linfocitos mostró un descenso significativo en los peces retados, con un posterior incremento hasta alcanzar al final del muestreo los valores de los peces control. La linfopenia junto con un incremento de granulocitos se ha descrito en septicemias bacterianas en tiburones (Clauss y col. 2008). Son varios los mecanismos responsables de la linfopenia en peces, como la migración de linfocitos desde la sangre periférica a los tejidos afectados, la destrucción de linfocitos mediada por lisinas producidas por el agente patógeno, y la disminución de la capacidad de linfopoyética (Murad y Houston 1988, Lamas y Ellis 1994, Pazos 1997, Densmore y col. 2001). La recuperación de los valores observada en los últimos muestreos se produciría por el incremento de células Ig<sup>+</sup> en los órganos hematopoyéticos (Bermúdez y col. 2006).

En el presente estudio se observaron además cambios significativos en el número de trombocitos, con una tendencia a la disminución. Al igual que ocurre en los mamíferos, los trombocitos desempeñan un papel fundamental en la hemostasia primaria produciéndose su agregación durante el daño endotelial (Jagadeeswaran y col. 1999, Jagadeeswaran y col. 2005). Por ello, la trombocitopenia observada en el presente estudio sería consecuencia de una coagulación intravascular diseminada (Harms y col. 1996). Las observaciones clínicas e histológicas corroboran esa hipótesis.

Algunos autores han descrito descensos en el valor hematocrito en peces experimentalmente inoculados con *Aeromonas hydrophila* (Harikrishnan y col. 2003) y atribuyeron dicho descenso a la destrucción de eritrocitos por parte de la bacteria. En nuestro trabajo, los valores ligeramente inferiores del valor hematocrito en los rodaballos infectados por *T. maritimum* podrían deberse también a la producción de hemolisinas capaces de lisar eritrocitos. En estudios previos se ha demostrado que las cepas de *T. maritimum* producen hemolisinas activas frente a eritrocitos de rodaballo, trucha, salmón, carnero y pollo (Pazos 1997) y que la inyección de las hemolisinas purificadas a partir de los productos extracelulares (ECP) producían elevadas mortalidades (Baxa y col. 1988).



**CAPÍTULO 10.**  
**CONCLUSIONES**



1. La piel del rodaballo presentó similitudes histológicas, inmunohistoquímicas y ultraestructurales con la de otras especies de teleósteos. La aportación más novedosa del presente trabajo ha sido la caracterización morfológica y de la distribución de los cromatóforos en el tegumento.
2. La técnica inmunohistoquímica (IHQ), realizada sobre muestras incluidas en parafina, se confirmó como una herramienta útil y válida para el diagnóstico de la tenacibaculosis marina y para el estudio de la patogenia de la enfermedad, contribuyendo a la consecución de los principales resultados de este trabajo.
3. La enfermedad ulcerativa del lenguado tiene dos formas de presentación clínica: crónica y septicémica, demostrándose que *Tenacibaculum maritimum* está implicado en el desarrollo de ambos cuadros y que dicha enfermedad presenta similitudes con la tenacibaculosis del rodaballo.
4. La forma crónica se caracteriza macroscópicamente por la presentación de una o dos úlceras cutáneas severas, de forma triangular, localizadas fundamentalmente en la parte central de las aletas dorsal y ventral. Histológicamente muestran pérdida total de epidermis y dermis, necrosis de los paquetes musculares e incluso hueso, y la presencia de un infiltrado inflamatorio con predominio de macrófagos -dermatitis y celulitis necrotizante crónica severa asociada a mionecrosis-.
5. La forma septicémica se caracteriza macroscópicamente por la presentación de lesiones erosivas y ulcerativas en piel de

leves a moderadas, acompañadas de petequias y equimosis en la base de las aletas. Histológicamente las lesiones cutáneas se corresponden con una dermatitis y celulitis necrotizante aguda de leve a moderada, acompañada de mionecrosis, y un discreto infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por granulocitos. La detección inmunohistoquímica del antígeno y la identificación bacteriológica de *T. maritimum* en las lesiones de piel y en órganos internos, demuestra la infección sistémica.

6. Las características morfológicas de las lesiones ulcerativas en los lenguados infectados de manera natural con *T. maritimum*, y su asociación con la detección del antígeno y el aislamiento bacteriano, indica que la puerta de entrada de la bacteria es la piel y a partir de este punto, alcanza la circulación sanguínea y se distribuye hacia el resto de los órganos internos.
7. En la tenacibaculosis del lenguado y rodaballo, la necrosis severa de la dermis, hipodermis y musculatura que caracteriza la enfermedad y la observación del antígeno de *T. maritimum* siguiendo el soporte fibrilar de la hipodermis y del perimio, sugiere la participación de productos extracelulares bacterianos con alta actividad proteolítica en el desarrollo de las lesiones.
8. La detección de bacterias filamentosas positivas al anticuerpo anti-*T. maritimum* en el intestino, sin alteraciones histológicas, de los lenguados infectados de manera natural

indica que este órgano puede actuar como reservorio de la bacteria. Asimismo, la distribución y progresión del antígeno bacteriano desde la serosa intestinal hacia la superficie de la mucosa, observada en rodaballos infectados experimentalmente por vía intraperitoneal, explicaría que la bacteria es capaz de alcanzar el lumen intestinal desde la cavidad celómica.

9. Las vías de inoculación subcutánea e intraperitoneal son modelos experimentales válidos para el estudio de la tenacibaculosis, desarrollando en ambos casos la forma septicémica. Además, la inoculación subcutánea en el seno dorsal medio constituye una vía de distribución de la bacteria más rápida y capaz de reproducir las úlceras cutáneas características de la enfermedad.
10. Los cambios significativos en el número y cinética de las células Ig<sup>+</sup> observados en los rodaballos infectados por vía subcutánea, indican el desarrollo de una respuesta humoral frente a la infección. Además, la caracterización inmunohistoquímica empleada ha supuesto una herramienta complementaria para el estudio *in situ* de la respuesta adaptativa frente a *T. maritimum*.
11. Los cambios hematológicos observados en la tenacibaculosis en rodaballo, coinciden con los cambios característicos de infecciones bacterianas agudas en mamíferos, confirmando que la hematología contribuye a determinar el estado sanitario del pez.



**CAPÍTULO 11.**  
**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS GENERALES**



Alonso MC, Cano I, García-Rosado E, Castro D, Lamas J, Barja JL, Borrego JJ (2005). Isolation of lymphocystis disease virus from sole, *Solea senegalensis* Kaup, and blackspot sea bream, *Pagellus bogaraveo* (Brünnich). *Journal of Fish Diseases* 28:221-228.

Alsina M, Blanch AR (1993). First isolation of *Flexibacter maritimus* from cultivated turbot (*Scophthalmus maximus*). *Bulletin European Association Fish Pathology*. 13:157-160.

Álvarez-Pellitero P (2004). Report about fish parasitic diseases. In: *Etudes et recherches OM*. Ed: Álvarez-Pellitero P, Barja JL, Basurco B, Berthe F, Toranzo AE. CIHEAM/FAO, Zaragoza, p 103-130.

Álvarez-Pellitero P, Palenzuela O, Padrós F, Sitjà-Bobadilla A, Riaza A, Silva R, Arán J (2004a). *Histophagous scuticociliatids* (Ciliophora) parasitizing turbot *Scophthalmus maximus*: morphology, *in vitro* culture and virulence. *Folia Parasitologica* 51:177-187.

Álvarez-Pellitero P, Quiroga MI, Sitjà-Bobadilla A, Redondo MJ, Palenzuela O, Padrós F, Vázquez S, Nieto JM (2004b). *Cryptosporidium scophthalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. *Diseases of Aquatic Organisms* 62:133-145.

Álvarez-Pellitero P (2008). Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 126:171-198.

Álvarez-Pellitero P, Pérez A, Quiroga MI, Redondo MJ, Vázquez S, Riaza A, Palenzuela O, Sitjà-Bobadilla A, Nieto JM (2009). Host and environmental risk factors associated with *Cryptosporidium scophthalmi* (Apicomplexa) infection in cultured turbot, *Psetta maxima* (L.) (Pisces, Teleostei). *Veterinary Parasitology* 165:207-215.

APROMAR (2009). La acuicultura marina de peces en España 2009, Chiclana, Cádiz. Disponible desde <http://www.apromar.es/Informes/informe%202009/Informe-APROMAR-2009.pdf>.

APROMAR (2010). La Acuicultura Marina de Peces en España 2010, Chiclana, Cádiz. Disponible desde <http://www.apromar.es/Informes/informe%202010/Informe-APROMAR-2010.pdf>.

APROMAR (2011). La Acuicultura Marina de Peces en España 2011, Chiclana, Cádiz. Disponible desde <http://www.apromar.es/Informes/informe%202011/Informe-APROMAR-2011.pdf>.

Arellano JM, Sarasquete C (2006). Atlas histológico del lenguado senegalés: "Solea senegalensis" (Kaup, 1858). Ed: Arellano JM, Sarasquete C. Madrid, Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Austin B, Austin DA (2007). Bacterial fish pathogens: diseases of farmed and wild fish. Ed: Kluwer Academic Pub. Group Praxis Publishing Ltd, Chichester, UK, Dordrecht.

Avendaño-Herrera R, Magariños B, López-Romalde S, Romalde JL, Toranzo AE (2004). Phenotypic characterization and description of two major O-serotypes in *Tenacibaculum maritimum* strains from marine fishes. *Diseases of Aquatic Organisms* 58:1-8.

Avendaño-Herrera RE (2005). Avances en el conocimiento del patógeno de peces *Tenacibaculum maritimum*, implicaciones en el diagnóstico y prevención de la enfermedad. Tesis Doctoral. Santiago of Compostela. Universidad de Santiago de Compostela.

Avendaño-Herrera R, Toranzo AE, Magariños B (2006a). Tenacibaculosis infection in marine fish caused by *Tenacibaculum maritimum*: a review. *Diseases of Aquatic Organisms* 71:255-266.

Avendaño-Herrera R, Toranzo AE, Magariños B (2006b). A challenge model for *Tenacibaculum maritimum* infection in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). Journal of Fish Diseases 29:371-374.

Avendaño-Herrera R, Irgang R, Magariños B, Romalde JL, Toranzo AE (2006c). Use of microcosms to determine the survival of the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum* in seawater. Environmental Microbiology 8:921-928.

Avendaño-Herrera R, Núñez S, Barja JL, Toranzo AE (2008). Evolution of drug resistance and minimum inhibitory concentration to enrofloxacin in *Tenacibaculum maritimum* strains isolated in fish farms. Aquaculture International 16:1-11.

**B**ader JA, Shotts EB (1998). Identification of *Flavobacterium* and *Flexibacter* species by species-specific polymerase chain reaction primers to the 16S ribosomal RNA gene. Journal of Aquatic Animal Health 10:311-319.

Bancroft JD, Cook HC, Stirling RW (1994). Manual of histological techniques and their diagnostic application. Ed: Churchill Livingstone, Edinburgh.

Baxa DV, Kawai K, Kusuda R (1986). Characteristics of gliding bacteria isolated from diseased cultured flounder, *Paralichthys olivaceous*. Fish Pathology 21:251-258.

Baxa DV, Kawai K, Kusuda R (1987). Experimental infection of *Flexibacter maritimus* in black sea bream (*Acanthopagrus schlegeli*) fry. Fish Pathology 22:105-109.

Baxa DV, Kawai K, Kusuda R (1988). *In vitro* and *in vivo* activities of *Flexibacter maritimus* toxins. Bulletin of Marine Sciences and Fisheries, Kochi University 10:1-8.

Bergh O, Nilsen F, Samuelsen OB (2001). Diseases, prophylaxis and treatment of the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*: a review. Diseases of Aquatic Organisms 48:57-74.

Bermúdez R, Vigliano F, Marcaccini A, Sitjà-Bobadilla A, Quiroga MI, Nieto JM (2006). Response of Ig-positive cells to *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) experimental infection in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.): A histopathological and immunohistochemical study. *Fish and Shellfish Immunology* 21:501-512.

Bermúdez R, Losada AP, Vázquez S, Redondo MJ, Álvarez-Pellitero P, Quiroga MI (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.

Bernardet JF, Grimont PAD (1989). Deoxyribonucleic acid relatedness and phenotypic characterization of *Flexibacter columnaris* sp. nov., nom. rev., *Flexibacter psychrophilus* sp. nov., nom. rev., and *Flexibacter maritimus* Wakabayashi, Hikida, and Masumura 1986. *International Journal of Systematic Bacteriology* 39:346-354.

Bernardet JF, Campbell AC, Buswell JA (1990). *Flexibacter maritimus* is the agent of “black patch necrosis” in Dover sole in Scotland. *Diseases of Aquatic Organisms* 8:233-237.

Bernardet JK, Kerouault B, Michel C (1994). Comparative study on *Flexibacter maritimus* strains isolated from farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in France. *Fish Pathology* 29:105-111.

Bernardet JF (1997). Immunization with bacterial antigens: *Flavobacterium* and *Flexibacter* infections. *Developments in Biological Standardization* 90:179-188.

Bernardet JF (1998). *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Flexibacter* and *Chryseobacterium* infections in cultured marine fish. *Fish Pathology* 33:229-238.

Bernardet JF, Nakagawa Y, Holmes B (2002). Proposed minimal standards for describing new taxa of the family *Flavobacteriaceae* and emended description of the family. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52:1049-1070.

Bjelland AM, Johansen R, Brudal E, Hansen H, Winther-Larsen HC, Sorum H (2012). *Vibrio salmonicida* pathogenesis analyzed by experimental challenge of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Microbial Pathogenesis* 52:77-84.

Blazer VS, Fabacher DL, Little EE, Ewing MS, Kocan KM (1997). Effects of ultraviolet-B radiation on fish: histologic comparison of a UVB-sensitive and UVB-tolerant species. *Journal of Aquatic Animal Health* 9:132-143.

Bodammer JE (2000). Some new observations on the cytopathology of fin erosion disease in winter flounder *Pseudopleuronectes americanus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 40:51-65.

Boes M, Prodeus AP, Schmidt T, Carroll MC, Chen J (1998). A critical role of natural immunoglobulin M in immediate defense against systemic bacterial infection. *The Journal of Experimental Medicine* 188:2381-2386.

Boes M (2000). Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Molecular Immunology* 37:1141-1149.

Bonilla RJ, Quintero M, Gómez E, Rodríguez D, Hurtado H (2008). Histología y morfometría de la piel del pez *Eremophilus mutisii* (Trychomecteridae, Siluriformes). *Revista de Biología Tropical* 56:885-893.

Branson E, Riaza A, Álvarez-Pellitero P (1999). Myxosporean infection causing intestinal disease in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), (Teleostei: Scophthalmidae). *Journal of Fish Diseases* 22:395-399.

Brudeseth BE, Raynard RS, King JA, Evensen O (2005). Sequential pathology after experimental infection with marine viral hemorrhagic septicemia virus isolates of low and high virulence in turbot (*Scophthalmus maximus* L). *Veterinary Pathology* 42:9-18.

Bruno D, Crumlish M, LaPatra S, Noguera P, Verner-Jeffreys D (2007). Workshop on salmonid skin diseases. In: pathologists EAAP. Ed: 13th International Conference on Fish and Shellfish Diseases, Grado, Italy.

Campbell AC, Buswell JA (1982). An investigation into the bacterial aetiology of 'black patch necrosis' in Dover sole, *Solea solea* L. *Journal of Fish Diseases* 5:495-508.

Carson J, Schmidtke L, Lewis T (1993). Development of a vaccine against disease. Results of efficacy testing of three types of vaccine. In: Barriers and breakthroughs. Papers from the Saltas. Research and development review seminar, Hobart, Tasmania, p 149-158.

Castillo-Briceño P, Sepulcre MP, Chaves-Pozo E, Meseguer J, García-Ayala A, Mulero V (2009). Collagen regulates the activation of professional phagocytes of the teleost fish gilthead seabream. *Molecular Immunology* 46:1409-1415.

Castro N, Toranzo AE, Barja JL, Núñez S, Magariños B (2006). Characterization of *Edwardsiella tarda* strains isolated from turbot, *Psetta maxima* (L.). *Journal of Fish Diseases* 29:541-547.

Castro N, Toranzo AE, Devesa S, González A, Núñez S, Magariños B (2012). First description of *Edwardsiella tarda* in Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *Journal of Fish Diseases* 35:79-82.

Cepeda C, Santos Y (2002). First isolation of *Flexibacter maritimus* from farmed Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) in Spain. *Bulletin European Association Fish Pathologists* 22:388-392.

Cepeda C, García-Márquez S, Santos Y (2003). Detection of *Flexibacter maritimus* in fish tissue using nested PCR amplification. *Journal of Fish Diseases* 26:65-70.

Chaves-Pozo E, Pelegrín P, García-Castillo J, García-Ayala A, Mulero V, Meseguer J (2004). Acidophilic granulocytes of the marine fish gilthead seabream (*Sparus aurata*

L.) produce interleukin-1beta following infection with *Vibrio anguillarum*. Cell and Tissue Research 316:189-195.

Chen ME, Henry-Ford D, Groff JM (1995). Isolation and characterization of *Flexibacter maritimus* from marine fishes of California. Journal of Aquatic Animal Health 7:318-326.

Choi DH, Kim YG, Hwang CY, Yi H, Chun J, Cho BC (2006). *Tenacibaculum litoreum* sp. nov., isolated from tidal flat sediment. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56:635-640.

Clauss TM, Dove ADM, Arnold JE (2008). Hematologic disorders of fish. Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice 11:445-462.

Constenla M, Padrós F (2010). Histopathological and ultrastructural studies on a novel pathological condition in *Solea senegalensis*. Diseases of Aquatic Organisms 90:191-196.

Corrales J, Ullal A, Noga EJ (2009). Lateral line depigmentation (LLD) in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). Journal of Fish Diseases 32:705-712.

Corripio-Miyar Y, Mazorra de Quero C, Treasurer JW, Ford L, Smith PD, Secombes CJ (2007). Vaccination experiments in the gadoid haddock, *Melanogrammus aeglefinus* L., against the bacterial pathogen *Vibrio anguillarum*. Veterinary Immunology and Immunopathology 118:147-153.

Cuesta A, Meseguer J, Esteban MA (2004). Total serum immunoglobulin M levels are affected by immunomodulators in seabream (*Sparus aurata* L.). Veterinary Immunology and Immunopathology 101:203-210.

Cutrin JM, López-Vázquez C, Olveira JG, Castro S, Dopazo CP, Bandín I (2005). Isolation in cell culture and detection by PCR-based technology of IPNV-like virus from leucocytes of carrier turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). Journal of Fish Diseases 28:713-722.

Dagleish MP, Benavides J, Chianini F (2010). Immunohistochemical diagnosis of infectious diseases of sheep. *Small Ruminant Research* 92:19-35.

Dalmo RA, Ingebrigtsen K, Bøgwald J (1997). Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *Journal of Fish Diseases* 20:241-273.

de las Heras AI, Rodríguez Saint-Jean S, Pérez-Prieto SI (2010). Immunogenic and protective effects of an oral DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus in fish. *Fish and Shellfish Immunology* 28:562-570.

Delannoy CMJ, Houghton JDR, Fleming NEC, Ferguson HW (2011). Mauve Stingers (*Pelagia noctiluca*) as carriers of the bacterial fish pathogen *Tenacibaculum maritimum*. *Aquaculture* 311:255-257.

Densmore CL, Blazer VS, Waldrop TB, Pooler PS (2001). Effects of whirling disease on selected hematological parameters in rainbow trout. *Journal of Wildlife Diseases* 37:375-378.

Devesa S, Barja JL, Toranzo AE (1989). Ulcerative skin and fin lesions in reared turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Fish Diseases* 12:323-333.

Devesa S (1996). Patología del rodaballo *Scophthalmus maximus* L. cultivado en Galicia. Tesis Doctoral, Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela.

Domínguez-Merelles B (2009). Estudio de la respuesta inmune no específica en rodaballo (*Psetta maxima*, L). Proyecto Fin de Máster en Ingeniería Biotecnológica. Universidad de Santiago de Compostela.

Dykova I, Figueras A, Novoa B, Casal JF (1998). *Paramoeba* sp., an agent of amoebic gill disease of turbot *Scophthalmus maximus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 33:137-141.

Dykova I, Figueras A, Novoa B (1999). Epizoic amoebae from the gills of turbot *Scophthalmus maximus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 38:33-38.

Dykova I, Figueras A, Peric Z (2000). *Neoparamoeba* Page, 1987: light and electron microscopic observations on six strains of different origin. *Diseases of Aquatic Organisms* 43:217-223.

**E**l Morabit A, Carballás CG, Seoane R, Riaza A, Santos Y (2006). Flow cytometric study of phagocytic and oxidative burst activity of turbot head-kidney leucocytes in response to *Aeromonas salmonicida* and *Tenacibaculum maritimum*. *Recent Research Developments Microbiology*. 10:133-143.

Elliot DG (2000). Integumentary system. In: *The handbook of experimental animals*. Ed: Ostrander GK. Academic press, London. p. 95-107.

Ellis AE (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology* 25:827-839.

Erdal JI, Reitan LJ (1992). Immune response and protective immunity after vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. *Fish and Shellfish Immunology* 2:99-108.

Estévez J, Iglesias R, Leiro J, Ubeira FM, Sanmartín ML (1992). An unusual site of infection by a microsporean in the turbot *Scophthalmus maximus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 13:139-142.

Eyzaguirre E, Haque AK (2008). Application of immunohistochemistry to infection. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 132:424-431.

**F**alk K, Press CM, Landsverk T, Dannevig BH (1995). Spleen and kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) show histochemical changes early in the course of experimentally induced infectious salmon anaemia (ISA). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 49:115-126.

## *Referencias bibliográficas generales*

---

FAO (2010). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2010. Roma. FAO. Updated Mon May 21 14:09:15 CET 2012. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/013/i1820s/i1820s00.htm>

FAO (2011). Programa de información de especies acuáticas. *Psetta maxima* (Linnaeus, 1758). Updated Mon May 21 14:09:15 CET 2012. Disponible en [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Psetta\\_maxima\\_es/en.01/12/2011](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Psetta_maxima_es/en.01/12/2011).

Ferguson HW (1989). Systemic pathology of fish. A text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts. Ed: Churchill Livingstone. Iowa State University, Ames.

Ferguson HW (2006). Systemic pathology of fish. A text and atlas of normal tissues in teleost and their responses in disease. Ed: Ferguson HW, Second edition, Scotian Press, London, UK.

Ferguson HW, Girons A, Rizgalla G, LaPatra S, Branson EJ, MacKenzie K, Davies M, Collins RO, Diab A, Crumlish M (2006). Strawberry disease in rainbow trout in Scotland: pathology and association with *Flavobacterium psychrophilum*. The Veterinary Record 158:630-632.

Ferguson HW, Delannoy CMJ, Hay S, Nicolson J, Sutherland D, Crumlish M (2010). Jellyfish as vectors of bacterial disease for farmed salmon (*Salmo salar*). Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 22:376-382.

Flory CM (1990). Phylogeny of neuroimmunoregulation: effects of adrenergic and cholinergic agents on the *in vitro* antibody response of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Developmental and Comparative Immunology 14:283-294.

Fournier-Betz V, Quentel C, Lamour F, Leven A (2000). Immunocytochemical detection of Ig-positive cells in blood, lymphoid organs and the gut associated lymphoid tissue of the turbot (*Scophthalmus maximus*). Fish and Shellfish Immunology 10:187-202.

Frette L, Jorgensen NOG, Irming H, Kroer N (2004). *Tenacibaculum skagerrakense* sp. nov., a marine bacterium isolated from the pelagic zone in Skagerrak, Denmark. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:519-524.

Fujii R (1993). Coloration and chromatophores. In: *The physiology of fishes*. Ed: Evans DH. Boca Raton: CRC Press, Florida pp. 535-562.

Fujii R (2000). The regulation of motile activity in fish chromatophores. *Pigment Cell Research* 13:300-319.

Goda M, Ohata M, Ikoma H, Fujiyoshi Y, Sugimoto M, Fujii R (2011). Integumental reddish-violet coloration owing to novel dichromatic chromatophores in the teleost fish, *Pseudochromis diadema*. *Pigment Cell and Melanoma Research* 24:614-617.

**G**arcía-Lamas N, García-González P, Fuentes-Edfuf C, Domínguez-Merelles B, Losada AP, Cabaleiro S, Seoane R, Santos Y (2010). Efecto de la infección con *Aeromonas salmonicida* y *Tenacibaculum maritimum* sobre la actividad respiratoria y el hematocrito en rodaballo. En: XII Foro dos Recursos Mariños e das Rías Galegas Galegas. Ed: XII Foro dos Recursos Mariños e das Rías Galegas, p 377-384.

Gembella S, Bartsch P (2002). Architecture of the integument in lower Teleostomes: functional morphology and evolutionary implications. *Journal of Morphology* 253:290-309.

Gómez GD, Balcázar JL (2008). A review on the interactions between gut microbiota and the innate immunity of fish. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 52:145-154.

Gómez-Casado E, Estepa A, Coll JM (2011). A comparative review on European-farmed finfish RNA viruses and their vaccines. *Vaccine* 29:2657-2671.

González-Laxe F, Lupin HM, Bretón de la Cal JA (2004). *Acuicultura: producción, comercio y trazabilidad*, Netbiblo, A Coruña.

González SF, Santos Y (2009). Serological methods for the detection of pathogenic bacteria in aquaculture: present status and future prospects. En: Thangadurai D. Ed: Fisheries, aquaculture and biotechnology. Agrobios, India, p 131-147.

Grizzle JM, Wilmer AR (1976). Anatomy and histology of the channel catfish. Ed: Auburn University, Agricultural Experiment Station, Alabama, USA.

Groff JM (2001). Cutaneous biology and diseases of fish. Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice 4:321-411.

**H**agiwara H, Takano R, Noguchi M, Narita M (2009). A study of the lesions induced in *Seriola dumerili* by intradermal or intraperitoneal injection of *Streptococcus dysgalactiae*. Journal of Comparative Pathology 140:25-30.

Handlinger J, Soltani M, Percival S (1997). The pathology of *Flexibacter maritimus* in aquaculture species in Tasmania, Australia. Journal of Fish Diseases 20:159-168.

Hansen GH, Bergh O, Michaelsen J, Knappskog D (1992). *Flexibacter ovolyticus* sp. nov., a pathogen of eggs and larvae of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. International Journal of Systematic Bacteriology 42:451-458.

Harikrishnan R, Nisha Rani M, Balasundaram C (2003). Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. Aquaculture 221:41-50.

Harms CA, Sullivan CV, Hodson RG, Stoskopf MK (1996). Clinical pathology and histopathology characteristics of net-stressed *Striped bass* with "Red Tail". Journal of Aquatic Animal Health 8:82-86.

Haugarvoll E, Bjerkas I, Szabo NJ, Satoh M, Koppang EO (2010). Manifestations of systemic autoimmunity in vaccinated salmon. Vaccine 28:4961-4969.

Heumann D, Roger T (2002). Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clinica Chimica Acta* 323:59-72.

Hikida M, Wakabayashi H, Egusa S, Masumura K (1979). *Flexibacter* sp., a gliding bacterium pathogenic to some marine fishes in Japan. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 45:421-428.

Holmes B (1992). Synonymy of *Flexibacter maritimus* Wakabayashi, Hikida, and Masumura 1986 and *Cytophaga marina* Reichenbach 1989. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42:185.

Horne MT, Richards RH, Roberts RJ, Smith PC (1977). Peracute vibriosis in juvenile turbot *Scophthalmus maximus*. *Journal of Fish Biology* 11:355-361.

Iglesias R, Parama A, Álvarez MF, Leiro J, Fernández J, Sanmartin ML (2001). *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida) as the causative agent of scuticociliatosis in farmed turbot *Scophthalmus maximus* in Galicia (NW Spain). *Diseases of Aquatic Organisms* 46:47-55.

Iglesias R, Parama A, Álvarez MF, Leiro J, Ubeira FM, Sanmartin ML (2003). *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora: Scuticociliatida) expresses surface immobilization antigens that probably induce protective immune responses in turbot. *Parasitology* 126:125-134.

Imagawa T, Hashimoto Y, Kon Y, Sugimura M (1991). Immunoglobulin containing cells in the head kidney of carp (*Cyprinus carpio* L.) after bovine serum albumin injection. *Fish and Shellfish Immunology* 1:173-185.

Iwama G, Nakanishi T (1996). The fish immune system: organism, pathogen, and environment. Ed: Iwama G, Nakanishi T. Academic Press, San Diego, California.

Jagadeeswaran P, Sheehan JP, Craig FE, Troyer D (1999). Identification and characterization of zebrafish thrombocytes. *British Journal of Haematology* 107:731-738.

Jagadeeswaran P, Gregory M, Day K, Cykowski M, Thattaliyath B (2005). Zebrafish: a genetic model for hemostasis and thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 3:46-53.

Jensen S, Bergh O, Enger O, Hjeltnes B (2002). Use of PCR-RFLP for genotyping 16S rRNA and characterizing bacteria cultured from halibut fry. *Canadian Journal of Microbiology* 48:379-386.

Jones SR (2001). The occurrence and mechanisms of innate immunity against parasites in fish. *Developmental and Comparative Immunology* 25:841-852.

Jung SY, Oh TK, Yoon JH (2006). *Tenacibaculum aestuarii* sp. nov., isolated from a tidal flat sediment in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56:1577-1581.

**K**aleta K (2008). Morphological analysis of chromatophores in the skin of trout. *Bulletin of the Veterinary Institute of Pulawy* 53:117-121.

King JA, Snow M, Skall HF, Raynard RS (2001). Experimental susceptibility of Atlantic salmon *Salmo salar* and turbot *Scophthalmus maximus* to european freshwater and marine isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus. *Diseases of Aquatic Organisms* 47:25-31.

Kodama H, Denso, Nakagawa T (2007). Protection against atypical *Aeromonas salmonicida* infection in carp (*Cyprinus carpio* L.) by oral administration of humus extract. *The Journal of Veterinary Medical Science* 69:405-408.

Koumans-van Diepen JE, van de Lisdonk MHM, Taverne-Thiele AJ, Verburg-van Kemenade BML, Rombout JHWM (1994). Characterisation of immunoglobulin-binding leucocytes in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Developmental and Comparative Immunology* 18:45-56.

**L**amas J, Ellis AE (1994). Atlantic salmon (*Salmo salar*) neutrophil responses to *Aeromonas salmonicida*. *Fish and Shellfish Immunology* 4:201-219.

Lamers CH, De Haas MJ (1985). Antigen localization in the lymphoid organs of carp (*Cyprinus carpio*). Cell and Tissue Research 242:491-498.

LaPatra SE, Plant KP, Alcorn S, Ostland V, Winton J (2010). An experimental vaccine against *Aeromonas hydrophila* can induce protection in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases 33:143-151.

Larsen JL, Pedersen K (1996). Atypical *Aeromonas salmonicida* isolated from diseased turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Acta Veterinaria Scandinavica 37:139-146.

Laudan R, Stolen JS, Cali A (1986). The immune response of a marine teleost, *Pseudopleuronectes americanus*, (winter flounder) to the protozoan parasite *Glugea stephani*. Veterinary Immunology and Immunopathology 12:403-412.

Law M (2001). Differential diagnosis of ulcerative lesions in fish. Environmental Health Perspectives 109 Suppl 5:681-686.

Le Guellec D, Morvan-Dubois G, Sire JY (2004). Skin development in bony fish with particular emphasis on collagen deposition in the dermis of the zebrafish (*Danio rerio*). International Journal of Developmental Biology 48:217-231.

Leiro J, Iglesias R, Ubeira FM, Sanmartín ML (2001). Non-isotopic detection of *Tetramicra brevifilum* (Microspora) DNA in turbot tissues. Journal of Parasitology 87:1488-1490.

Long JH Jr, Hale ME, McHenry MJ, Westneat MW (1996). Functions of fish skin: the mechanics of steady swimming in longnose gar, *Lepisosteus osseus*. Journal of Experimental Biology 199: 2139-2151.

López JR, Piñeiro-Vidal M, García-Lamas N, De La Herran R, Navas JI, Hachero-Cruzado I, Santos Y (2010). First isolation of *Tenacibaculum soleae* from diseased cultured wedge sole, *Dicologlossa cuneata* (Moreau), and brill, *Scophthalmus rhombus* (L.). Journal of Fish Diseases 33:273-278.

Lovoll M, Wiik-Nielsen CR, Tunsjo HS, Colquhoun D, Lunder T, Sorum H, Grove S (2009). Atlantic salmon bath challenged with *Moritella viscosa*-Pathogen invasion and host response. *Fish and Shellfish Immunology* 26:877-884.

**M**agariños B, Pazos F, Santos Y, Romalde JL, Toranzo AE (1995). Response of *Pasteurella piscicida* and *Flexibacter maritimus* to skin mucus of marine fish. *Diseases of Aquatic Organisms* 21:103-108.

Magariños B, Devesa S, González A, Castro N, Toranzo AE (2011). Furunculosis in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) cultured in a recirculation system. *Veterinary Record* 168:431.

Magnadóttir B (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish Immunology* 20:137-151.

Magnadóttir B (2010). Immunological control of fish diseases. *Marine Biotechnology* 12:361-379.

Mastan SA, Qureshi TA (2001). Role of bacteria in the epizootic ulcerative syndrome (EUS) of fishes. *Journal of Environmental Biology* 22:187-192.

Mastan SA, Qureshi TA (2003) Observations on the histological alterations in various tissues of EUS affected fish, *Channa striatus* (Bloch) *Journal of Environmental Biology* 24:405-410.

Masumura K, Wakabayashi H (1977). An outbreak of gliding bacterial disease in hatchery-born red seabream (*Pagrus major*) and gilthead (*Acanthopagrus schlegeli*) fry in Hiroshima. *Fish Pathology* 12:171-177.

Meyer W, Seegers U, Stelzer R (2007). Sulphur, thiols and disulphides in the fish epidermis, with remarks on keratinization. *Journal of Fish Biology* 71:1135-1144.

McVicar AH, White PG (1979). Fin and skin necrosis of cultivated Dover sole *Solea solea* (L.). *Journal of Fish Diseases* 2:557-562.

McVicar AH, White PG (1982). The prevention and cure of an infectious disease in cultivated juvenile Dover sole, *Solea solea* (L.). *Aquaculture* 26:213-222.

Millán A, Gómez-Tato A, Pardo B, Fernández C, Bouza C, Vera M, Álvarez-Dios J, Cabaleiro S, Lamas J, Lemos M, Martínez P (2011). Gene expression profiles of the spleen, liver, and head kidney in turbot (*Scophthalmus maximus*) along the infection process with *Aeromonas salmonicida*; using an immune-enriched oligo-microarray. *Marine Biotechnology* 6:1099-1114.

Mitchell SO, Rodger HD (2011). A review of infectious gill disease in marine salmonid fish. *Journal of Fish Diseases* 34:411-432.

Moriñigo MA, Zorrilla I, Chabrilón M, Arijo S, Díaz P, Balebona MC (2001). Isolation and characterization of *Vibrio harveyi* strains causing infection in sole (*Solea senegalensis*). 10th International Conference of the European Association of Fish Pathologists, Dublin, Irlanda.

Murad A, Houston AH (1988). Leucocytes and leucopoietic capacity in goldfish, *Carassius auratus*, exposed to sublethal levels of cadmium. *Aquatic Toxicology* 13:141-154.

Moll I (1991). Die entwicklung der epidermis vom fisch zum menschen. *Der Hautarzt* 42:350-355.

Noga EJ (2000). Skin ulcers in fish: *Pfiesteria* and other etiologies. *Toxicologic Pathology* 28:807-823.

Noga EJ (2010). Fish disease: diagnosis and treatment. Ed: Wiley-Blackwell, Ames, Iowa.

Novoa B, Núñez S, Fernández-Puentes C, Figueras AJ, Toranzo AE (1992). Epizootic study in a turbot farm: bacteriology, virology, parasitology and histology. *Aquaculture* 107:253-258.

Novoa B, Rivas C, Toranzo AE, Figueras A (1995). Pathogenicity of birnaviruses isolated from turbot (*Scophthalmus maximus*): comparison with reference serotypes of IPNV. *Aquaculture* 130:7-14.

**O**labuenaga SE (2000). Sistema inmune en peces. *Gayana (Concepción)* 64:205-215.

Olsen AB, Nilsen H, Sandlund N, Mikkelsen H, Sørum H, Colquhoun DJ (2011). *Tenacibaculum* sp. associated with winter ulcers in sea-reared Atlantic salmon *Salmo salar*. *Disease of Aquatic Organisms* 94:189-199.

Oppenheim JJ, Yang D (2005). Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Current Opinion in Immunology* 17:359-365.

Ostland VE, LaTrace C, Morrison D, Ferguson HW (1999). *Flexibacter maritimus* associated with a bacterial stomatitis in Atlantic salmon smolts reared in net-pens in British Columbia. *Journal of Aquatic Animal Health* 11:35-44.

Ottesen OH, Olafsen JA (1997). Ontogenetic development and composition of the mucous cells and the occurrence of saccular cells in the epidermis of Atlantic halibut. *Journal of Fish Biology* 50:620-633.

**P**adrós F, Zarza C, Estévez A, Crespo S, Furones MD (2003). La patología como factor limitante para el desarrollo del cultivo del lenguado. Update Thu Apr 26 20:56:15 CET 2012. Disponible desde [http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/pesca/acuicultura/descargas/Patologia/19\\_patologia\\_factor\\_limitante\\_lenguado.pdf](http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/pesca/acuicultura/descargas/Patologia/19_patologia_factor_limitante_lenguado.pdf).

Padrós F, Zarza C, Dopazo L, Cuadrado M, Crespo S (2006). Pathology of *Edwardsiella tarda* infection in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). Journal of Fish Diseases 29:87-94.

Pakingking Jr R, Bautista NB, de Jesús-Ayson EG, Reyes O (2010). Protective immunity against viral nervous necrosis (VNN) in brown-marbled grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) following vaccination with inactivated betanodavirus. Fish and Shellfish Immunology 28:525-533.

Palenzuela O, Redondo MJ, Álvarez-Pellitero P (2002). Description of *Enteromyxum scophthalmi* gen. nov., sp. nov. (Myxozoa), an intestinal parasite of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) using morphological and ribosomal RNA sequence data. Parasitology 124:369-379.

Pazos F, Santos Y, Núñez S, Toranzo AE (1993). Increasing occurrence of *Flexibacter maritimus* in marine aquaculture of Spain. Fish Health Section. Asian Fisheries Society. Newsletter 21:1-2.

Pazos F (1997). "Flexibacter maritimus": estudio fenotípico, inmunológico y molecular. Tesis Doctoral, Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela.

Pedersen K, Kofod H, Dalsgaard I, Larsen JL (1994). Isolation of oxidase-negative *Aeromonas salmonicida* from diseased turbot *Scophthalmus maximus*. Diseases of Aquatic Organisms 18:149-154.

Pepin JF, Emery E (1993). Marine *Cytophaga*-like bacteria (CLB) isolated from diseased reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) from French Mediterranean coast. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 13:165-167.

Piñeiro-Vidal M (2004). Caracterización taxonómica de bacterias relacionadas con *Tenacibaculum maritimum*. Proyecto fin de carrera (Graduado Superior en Biotecnología). Universidad de Santiago de Compostela.

Piñeiro-Vidal M, Carballás CG, Gómez-Barreiro O, Riaza A, Santos Y (2008a). *Tenacibaculum soleae* sp. nov., isolated from diseased sole (*Solea senegalensis* Kaup). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58:881-885.

Piñeiro-Vidal M, Riaza A, Santos Y (2008b). *Tenacibaculum discolor* sp. nov. and *Tenacibaculum gallaicum* sp. nov., isolated from sole (*Solea senegalensis*) and turbot (*Psetta maxima*) culture systems. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58:21-25.

Piñeiro-Vidal M, Gijón D, Zarza C, Santos Y (2012). *Tenacibaculum dicentrarchi* sp. nov. a novel marine bacteria of the family *Flavobacteriaceae* isolated from European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 62:425-429.

Powell M, Carson J, van Gelderen R (2004). Experimental induction of gill disease in Atlantic salmon *Salmo salar* smolts with *Tenacibaculum maritimum*. Diseases of Aquatic Organisms 61:179-185.

Press CM, Dannevig BH, Landsverk T (1994). Immune and enzyme histochemical phenotypes of lymphoid and nonlymphoid cells within the spleen and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Fish and Shellfish Immunology 4:79-93.

Puig L, Traveset R, Palenzuela O, Padrós F (2007). Histopathology of experimental scuticociliatosis in turbot *Scophthalmus maximus*. Diseases of Aquatic Organisms 76:131-140.

**Q**uentel C, Obach A (1992). The cellular composition of the blood and haematopoietic organs of turbot *Scophthalmus maximus* L. Journal of Fish Biology 41:709-716.

**R**amos MF, Costa AR, Barandela T, Saraiva A, Rodrigues PN (2007). Scuticociliate infection and pathology in cultured turbot *Scophthalmus maximus* from the north of Portugal. Diseases of Aquatic Organisms 74:249-253.

Ramos-Vara JA, Kiupel M, Baszler T, Bliven L, Brodersen B, Chelack B, Czub S, Del Piero F, Dial S, Ehrhart EJ, Graham T, Manning L, Paulsen D, Valli VE, West K (2008). Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 20:393-413.

Rakers S, Gebert M, Uppalapati S, Meyer W, Maderson P, Sell AF, Kruse C, Paus R (2010). 'Fish matters': the relevance of fish skin biology to investigative dermatology. *Experimental Dermatology* 19:313-324.

Redondo MJ, Palenzuela O, Álvarez-Pellitero P (2004). Studies on transmission and life cycle of *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa), an enteric parasite of turbot *Scophthalmus maximus*. *Folia Parasitologica (Praha)* 51:188-198.

Reichenbach H. (1989). Genus I. Cytophaga Winogradsky 1929, 577, AL emend., p. 2015-2020. In Staley JT, Bryant MP, Pfennig N, Holt JG. Ed: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 3. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.

Rico RM, Tapia-Paniagua S, Martinez-Manzanares E, Balebona MC, Moriñigo MA (2008). Characterization of *Vibrio harveyi* strains recovered from diseased farmed Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Journal of Applied Microbiology* 105:752-760.

Roberts RJ (2001). *Fish pathology*. Third edition. W.B. Saunders, Edinburgh, UK.

Rombout JHWM, Bot HE, Taverne-Thiele JJ (1989). Immunological importance of the second gut segment of carp. *Journal of Fish Biology* 35:167-178.

Salati F, Cubadda C, Viale I, Kusuda R (2005). Immune response of sea bass *Dicentrarchus labrax* to *Tenacibaculum maritimum* antigens. *Fisheries Science* 71:563-567.

Salinas I, Zhang YA, Sunyer JO (2011). Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Developmental and Comparative Immunology* 35:1346-1365.

## *Referencias bibliográficas generales*

---

Samuelsen OB, Nerland AH, Jorgensen T, Schroder MB, Svasand T, Bergh O (2006). Viral and bacterial diseases of Atlantic cod *Gadus morhua*, their prophylaxis and treatment: a review. *Diseases of Aquatic Organisms* 71:239-254.

Santos Y, Pazos F, Barja JL (1999). *Flexibacter maritimus*, causal agent of flexibacteriosis in marine fish. In: ICES identification leaflets for diseases and parasites of fish and shellfish. Ed: Oliver G. International Council for the Exploration of the Sea, Copenhagen, Denmark 55:1-6.

Santos NM, Vale A, Sousa MJ, Silva MT (2002). Mycobacterial infection in farmed turbot *Scophthalmus maximus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 52:87-91.

Santos Y (2005). Principales enfermedades bacterianas en la piscicultura Ibérica: diagnóstico y vacunación. In: *Inmunología e inmunopatología en piscicultura*. Ed: Chaves E, García A, Meseguer J. Kiosco J.M.C., Murcia.

Savari A, Hedayati A, Safahieh A, Movahedinia A (2011). Characterization of blood cells and hematological parameters of yellowfin sea bream (*Acanthopagrus latus*) in some creeks of persian gulf. *World Journal of Zoology* 6:26-32.

Scapigliati G, Romano N, Buonocore F, Picchietti S, Baldassini MR, Prugnoli D, Galice A, Meloni S, Secombes CJ, Mazzini M, Abelli L (2002). The immune system of sea bass, *Dicentrarchus labrax*, reared in aquaculture. *Developmental and Comparative Immunology* 26:151-160.

Schmidtke L, Carson J, Howard T (1991). Marine *Flexibacter* infection in Atlantic salmon. Characterization of the putative pathogens. In: *Proceedings of the Saltas research review seminar*, p 25-39.

Schrøder MB, Ellingsen T, Mikkelsen H, Norderhus EA, Lund V (2009). Comparison of antibody responses in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) to *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida* and *Francisella* sp. *Fish and Shellfish Immunology* 27:112-119.

Sheu SY, Lin KY, Chou JH, Chang PS, Arun AB, Young CC, Chen WM (2007). *Tenacibaculum litopenaei* sp. nov., isolated from a shrimp mariculture pond. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57:1148-1153.

Shiomi K, Uematsu H, Ito H, Yamanaka H, Kikuchi T (1990). Purification and properties of a lectin in the skin mucus of the dragonet *Repomucenus richardsonii*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 56: 119-123.

Sire JY, Huysseune A (2003). Formation of dermal skeletal and dental tissues in fish: a comparative and evolutionary approach. *Biological Reviews* 78:219-249.

Sire JY, Akimenko MA (2004). Scale development in fish: a review, with description of sonic hedgehog (shh) expression in the zebrafish (*Danio rerio*). *International Journal of Developmental Biology* 48:233-247.

Sköld HN, Amundsen T, Svensson PA, Mayer I, Bjelvenmark J, Forsgren E (2008). Hormonal regulation of female nuptial coloration in a fish. *Hormones and behavior* 54:549-556.

Snow M, Smail DA (1999). Experimental susceptibility of turbot *Scophthalmus maximus* to viral haemorrhagic septicaemia virus isolated from cultivated turbot. *Diseases of Aquatic Organisms* 38:163-168.

Snow M, King JA, Garden A, Shanks AM, Raynard RS (2005). Comparative susceptibility of turbot *Scophthalmus maximus* to different genotypes of viral haemorrhagic septicaemia virus. *Diseases of Aquatic Organisms* 67:31-38.

Soltani M, Munday BL, Burke CM (1996). The relative susceptibility of fish to infections by *Flexibacter columnaris* and *Flexibacter maritimus*. *Aquaculture* 140:259-264.

Stone LM, Finger TE, Tam PP, Tan SS (1995). Taste receptor cells arise from local epithelium, not neurogenic ectoderm. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92:1916-1920.

Suzuki M, Nakagawa Y, Harayama S, Yamamoto S (2001). Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine *Cytophaga*-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amylolyticum* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51:1639-1652.

**T**okuda Y, Toyohara H, Ikemoto M, Kina T, Sakaguchi M (2000). Distribution of immunoglobulin-positive cells in the spleen and kidney of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fisheries Science 66:1082-1086.

Toranzo AE, Barja JL (1992). First report of furunculosis in turbot (*Scophthalmus maximus*) rearing in floating cage in north-west of Spain. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 12:147-149.

Toranzo AE, Dopazo CP, Romalde JL, Santos Y, Barja JL (1997). Estado actual de la patología bacteriana y vírica en la piscicultura española. Revista AquaTIC, nº 1, Noviembre 1997. Update Mon May 21 14:50:15 CET 2012. Disponible el 08/04/2011 en URL: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=h&c=18>.

Toranzo AE, Avendaño-Herrera R, López-Vázquez C, Magariños B, Dopazo CP, Romalde JL, Barja JL (2003). Principales patologías bacterianas y víricas en lenguado cultivado: caracterización de los agentes etiológicos. Update Mon May 21 14:49:15 CET 2012. Disponible desde [http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/pesca/acuicultura/descargas/Patologia/26\\_princip\\_patol\\_bacterianas\\_lenguado.pdf](http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/pesca/acuicultura/descargas/Patologia/26_princip_patol_bacterianas_lenguado.pdf).

Toranzo AE, Magariños B, Romalde JL (2005). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. Aquaculture 246:37-61.

Toyama T, Kita-Tsukamoto K, Wakabayashi H (1996). Identification of *Flexibacter maritimus*, *Flavobacterium branchiophilum* and *Cytophaga columnaris* by PCR targeted 16S ribosomal DNA. Fish Pathology 31:25-31.

Treasurer J, Cox C (2008). Intraperitoneal and dorsal median sinus vaccination effects on growth, immune response, and reproductive potential in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*. *Aquaculture* 275:51-57.

Tyagi R, Shukla AN (2002). *Anatomy of fishes*. Ed: Anmol Publications Pvt. Ltd., New Delhi, India.

Udomkusonsri P, Noga EJ, Monteiro-Riviere NA (2004). Pathogenesis of acute ulceration response (AUR) in hybrid striped bass. *Diseases of Aquatic Organisms* 61:199-213.

Van der Marel M, Schroers V, Neuhaus H, Steinhagen D (2008). Chemotaxis towards, adhesion to, and growth in carp gut mucus of two *Aeromonas hydrophila* strains with different pathogenicity for common carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Diseases* 21:321-330.

van Gelderen R, Carson J, Nowak B (2009). Effect of extracellular products of *Tenacibaculum maritimum* in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* 32:727-731.

van Gelderen R, Carson J, Nowak B (2010). Experimentally induced marine flexibacteriosis in Atlantic salmon smolts *Salmo salar*. I. Pathogenicity. *Diseases of Aquatic Organisms* 91:121-128.

van Gelderen R, Carson J, Nowak B (2011). Experimentally induced marine flexibacteriosis in Atlantic salmon smolts *Salmo salar*. II. Pathology. *Diseases of Aquatic Organisms* 95:125-135.

Vilar P, Faílde LD, Bermúdez R, Vigliano F, Rianza A, Silva R, Santos Y, Quiroga MI (2012). Morphopathological features of a severe ulcerative disease outbreak associated with *Tenacibaculum maritimum* in cultivated sole, *Solea senegalensis* (L.). *Journal of Fish Diseases* 35:437-445.

## *Referencias bibliográficas generales*

---

Villamil L, Figueras A, Toranzo AE, Planas M, Novoa B (2003). Isolation of a highly pathogenic *Vibrio pelagius* strain associated with mass mortalities of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), larvae. *Journal of Fish Diseases* 26:293-303.

**W**akabayashi H, Hikida M, Masumura K (1984). *Flexibacter* infection in cultured marine fish in Japan. *Helgol Meeresunters* 37:587-593.

Wakabayashi H, Hikida M, Masumura K (1986). *Flexibacter maritimus* sp. nov., a pathogen of marine fishes. *International Journal of Systematic Bacteriology* 36:396-398.

Webb JF (2000). Mechanosensory lateral line: Microscopic anatomy and development. In: *The handbook of experimental animals*. Ed: Ostrand GK. Academic press, London, p 463-468.

Whitear M, Mittal AK (1986). Structure of the skin of *Agonus cataphractus* (Teleostei). *Journal of Zoology* 210:551-574.

Wiklund T, Bylund G (1993). Skin ulcer disease of flounder *Platichthys liesus* in the northern Baltic Sea. *Diseases of Aquatic Organisms* 17:165-174.

**Y**oon JH, Kang SJ, Oh TK (2005). *Tenacibaculum lutimaris* sp. nov., isolated from a tidal flat in the Yellow Sea, Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:793-798.

**Z**accone G, Tagliaferro G, Fasulo S, Contini A, Ainis L, Ricca MB (1990). Serotonin-like immunoreactivity in the epidermal club cells of teleost fishes. *Histochemistry* 93:355-357.

Zaccone R, Mancuso M (2008). First report on antibody response of *Seriola dumerilii* (Risso 1810) challenged with *Listonella anguillarum*. *Fish and Shellfish Immunology* 25:689-692.

Zorrilla I, Balebona MC, Moriñigo MA, Sarasquete C, Borrego JJ (1999). Isolation and characterization of the causative agent of pasteurellosis, *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*, from sole, *Solea senegalensis* (Kaup). Journal of Fish Diseases 22:167-172.

Zylberberg L, Chanet B, Wagemans F, Meunier FJ (2003). Structural peculiarities of the tubercles in the skin of the turbot, *Scophthalmus maximus* (L., 1758) (Osteichthyes, Pleuronectiformes, Scophthalmidae). Journal of Morphology 258:84-96.



## **CAPÍTULO 12.**

### **RESUMEN**



En la presente memoria se ha profundizado en el conocimiento de la tenacibaculosis que afecta al lenguado y al rodaballo, teniendo como principales objetivos el estudio de los aspectos relacionados con la morfopatología, el diagnóstico, la patogenia de la enfermedad y la respuesta de los peces frente a la infección.

Con el fin de dar cumplimiento a estos objetivos se plateó en primer lugar el estudio histológico, ultraestructural e inmunohistoquímico de la piel sana, utilizando como modelo el rodaballo de cultivo, con el propósito de sentar las bases para una correcta interpretación de los resultados de los estudios morfopatológicos, así como de la respuesta inmune frente a la infección. Para ello, se emplearon rodaballos sanos y se tomaron fragmentos de piel dorsal y ventral de ejemplares que mostraban diferente coloración externa.

Los resultados obtenidos mostraron que la piel del rodaballo presenta características morfológicas y estructurales similares a las descritas en la piel de la mayoría de los peces teleósteos, tanto bentónicos como pelágicos. Sin embargo, a diferencia de lo descrito en otras especies de peces, sólo se han identificado células goblet como células secretoras en la piel del rodaballo.

Otro aspecto abordado en esta Tesis ha sido el análisis de la pigmentación de la piel del rodaballo, debido a sus importantes implicaciones biológicas y económicas. Los resultados indicaron que la coloración externa que presenta el rodaballo es reflejo de las variaciones en el número y tipo de cromatóforos presentes (melanóforos, xantóforos e iridóforos), así como de la distribución e interrelaciones que se establecen entre ellos.

El segundo objetivo abordado ha sido la descripción de un síndrome ulcerativo observado en lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) cultivado en Galicia. Este síndrome fue estudiado mediante técnicas histológicas, de microscopía electrónica de barrido (SEM), así como por métodos microbiológicos convencionales y moleculares. Los resultados de este estudio han permitido describir por primera vez las características y manifestaciones de la forma crónica de la tenacibaculosis causada por *Tenacibaculum maritimum* en el lenguado.

La forma crónica de la enfermedad se caracterizaba por la presencia de 2-3 úlceras severas, localizadas principalmente en la zona central de las aletas dorsal y ventral de la piel del lenguado. Las úlceras alcanzaban las capas musculares donde se advirtió una pérdida total de epidermis y dermis, con necrosis de los paquetes musculares y un infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por macrófagos. Además, la forma de cuña de las úlceras observadas en los peces enfermos eran indicativas de que la lesión se había iniciado en la superficie de la piel y había progresado después hacia capas más profundas llegando a afectar al músculo. Estos resultados suponen nuevas pruebas que señalan a la piel como una puerta de entrada para *T. maritimum*. En la periferia de estas lesiones, además de la pérdida de la epidermis, se observaba que los melanóforos se agregaban en la capa pigmentaria de la dermis causando una despigmentación local que podría explicar el aspecto blanquecino de los bordes de las lesiones, descrito como signo característico en peces afectados de tenacibaculosis.

Otro de los resultados de interés de este estudio derivan del análisis de las muestras de lesiones severas de la piel mediante SEM. En estas

muestras se observó una intensa ulceración de la región central de las escamas y la presencia de bacterias filamentosas en la superficie y entre los radios de las escamas. Las escamas, compuestas por una capa superficial que contiene hidroxiapatita y carbonato de calcio y una capa más profunda constituida fundamentalmente por colágeno, podrían actuar como una fuente de nutrientes para *T. maritimum*, particularmente de calcio y proteínas contribuyendo, por tanto, a su crecimiento y supervivencia.

Con el objeto de desarrollar herramientas útiles y válidas para el diagnóstico y el estudio de la patogenia de la tenacibaculosis tanto en lenguado como en rodaballo se llevó a cabo la puesta a punto de una técnica de inmunohistoquímica (IHQ). Para ello, se emplearon muestras histológicas de lenguados procedentes de diferentes brotes de la enfermedad ulcerativa, ocurridos entre los años 2004 a 2005 y en los que se había aislado e identificado *T. maritimum* como agente causal de la infección. Paralelamente, se realizó una inoculación experimental en lenguados empleando la bacteria *T. maritimum* administrada por vía subcutánea. La toma de muestras se realizó a diferentes tiempos post-inoculación. Tras el sacrificio se realizó la necropsia y se tomaron secciones de la piel de todo el pez que también incluían hipodermis y musculatura, y muestras de bazo, riñón, branquias, hígado, timo, corazón, encéfalo y tracto gastrointestinal (esófago, estómago, ciegos pilóricos, intestino anterior, medio y posterior), que se fijaron y procesaron siguiendo los procedimientos habituales. Las secciones se recogieron en portaobjetos tratados con silane y se realizaron técnicas de tinción de rutina e IHQ, empleando un anticuerpo policlonal anti-*T. maritimum* purificado mediante cromatografía de afinidad. Los

ejemplares retados con la bacteria se utilizaron como controles positivos de *T. maritimum* para la puesta a punto de las técnicas IHQ. Para el aislamiento y caracterización microbiológica mediante métodos convencionales y moleculares, se tomaron muestras de piel y órganos internos en condiciones asépticas y se sembraron en medios de cultivo generales, selectivos y diferenciales o se procesaron para la obtención y amplificación del ADN bacteriano y su posterior análisis mediante técnicas electroforéticas.

Los resultados de este estudio demostraron que el antígeno bacteriano se localizaba en la piel y órganos internos de los lenguados afectados por el brote de la enfermedad ulcerativa y también en las muestras de tejido obtenidas a partir de los lenguados inoculados experimentalmente con *T. maritimum*. Este estudio permitió confirmar que la bacteria utiliza la piel como vía de entrada en el pez desde donde alcanza la circulación sanguínea y se distribuye hacia el resto de los órganos internos (forma septicémica). Además, la detección de los antígenos de *T. maritimum* en el lumen gastrointestinal de los lenguados que presentaron tenacibaculosis de forma natural, indicaría que este órgano puede actuar como reservorio de la enfermedad.

A pesar de la repercusión que *T. maritimum* y otras bacterias filamentosas del género *Tenacibaculum* tienen para la industria acuícola, el modo de transmisión y la vía de infección continúan sin esclarecerse. Además, aunque se han llevado a cabo diferentes estudios encaminados a obtener un modelo experimental que permita reproducir la enfermedad, de manera similar a como se manifiesta en condiciones naturales, hasta el momento no se han obtenido resultados

satisfactorios. Por otra parte, los mecanismos de defensa que se activan específicamente frente a *T. maritimum* no se conocen con exactitud.

Por todo ello, en el presente trabajo de investigación, se evaluaron dos modelos de infección experimental en rodaballo mediante inyección subcutánea e intraperitoneal, con el propósito de profundizar en el conocimiento de la patogenia y de la respuesta inmune del rodaballo frente a la infección. En primer lugar se infectaron experimentalmente rodaballos mediante inyección subcutánea de 0,1 ml de una suspensión de *T. maritimum* ( $10^8$  ufc/pez). En el segundo modelo experimental se utilizó la vía intraperitoneal para la inoculación y se testaron dos suspensiones de *T. maritimum* diferentes ( $10^9$  ufc/pez y  $10^8$  ufc/pez). En todos los ensayos, los grupos de peces control se inyectaron por la vía estudiada, con 0,1 ml de solución salina estéril. La toma de muestras se realizó a diferentes tiempos post-inoculación. En primer lugar, se extrajo la sangre de los peces mediante punción de la vena caudal y, tras el sacrificio, se realizó la necropsia y se procedió a la toma de muestras de piel de que también incluían hipodermis y musculatura, bazo, riñón, branquias, hígado, timo, corazón, encéfalo y tracto gastrointestinal. Las muestras se procesaron para la realización de estudios histopatológicos y de IHQ.

El cuadro histológico y el estudio de la distribución antigénica permitió demostrar que ambas vías pueden ocasionar la forma septicémica de la tenacibaculosis aunque con diferente patrón de distribución. Además, la distribución sistémica del antígeno ocurrió de manera más rápida en la vía subcutánea, y fue la única capaz de reproducir las lesiones ulcerativas características de la enfermedad. Por otro lado, los hallazgos

en este experimento mostraron similitudes evidentes con la infección natural y experimental en lenguados. Además, la necrosis severa de la dermis, hipodermis y musculatura que caracteriza la enfermedad en rodaballo y lenguado y la observación del antígeno de *T. maritimum* siguiendo el soporte fibrilar de la hipodermis y del perimio, sugieren la participación de los productos extracelulares bacterianos, que poseen alta actividad proteolítica, en el desarrollo de las lesiones.

Finalmente, se emplearon técnicas de IHQ para la evaluación del número y distribución de las células Ig<sup>+</sup> en rodaballos infectados experimentalmente con *T. maritimum*. Paralelamente, se examinaron los cambios en el valor hematocrito y en los leucocitos circulantes de los rodaballos inoculados experimentalmente. En este estudio se emplearon las muestras histológicas y sanguíneas del grupo de rodaballos inoculados por vía subcutánea. Los resultados obtenidos indican que la infección por *T. maritimum* en el rodaballo induce una respuesta inmune humoral que implica cambios en el número y distribución de células Ig<sup>+</sup> así como modificaciones en los valores hematológicos en sangre periférica.