



Universidad de Santiago de Compostela

Departamento de Microbiología y Parasitología

Facultad de Biología/CIBUS - Instituto de Acuicultura

Edwardsiella tarda : patógeno emergente en el cultivo del rodaballo



Nuria Castro Iglesias

Tesis Doctoral - 2011



Departamento de Microbiología y Parasitología
Facultad de Biología / CIBUS – Instituto de Acuicultura
Universidad de Santiago de Compostela

***Edwardsiella tarda*: patógeno emergente en
el cultivo del rodaballo**

Nuria Castro Iglesias

2011



Departamento de Microbiología y Parasitología
Facultad de Biología / CIBUS – Instituto de Acuicultura
Universidad de Santiago de Compostela

***Edwardsiella tarda*: patógeno emergente en el cultivo del rodaballo**

Memoria que presenta

Nuria Castro Iglesias

para optar al Grado de
Doctor en Ciencias Biológicas

Santiago de Compostela, 2011



Departamento de Microbiología y Parasitología

Facultade de Bioloxía/CIBUS – Instituto de Acuicultura

Alicia Estévez Toranzo, Catedrática del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela, y

Beatriz Magariños Ferro, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela

Informan:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “**Edwardsiella tarda: patógeno emergente en el cultivo del rodaballo**” que presenta Dña. **Nuria Castro Iglesias** para optar al Grado de Doctor en ciencias Biológicas, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología y Parasitología/CIBUS e Instituto de Acuicultura de la Universidad de Santiago de Compostela, y considerando que se haya concluida, autorizamos a su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmamos el presente informe en Santiago de Compostela a 27 de Junio de 2011.

Fdo. Alicia Estévez Toranzo

Fdo. Beatriz Magariños Ferro

La doctoranda,

Fdo. Nuria Castro Iglesias

El trabajo descrito en la presente memoria ha sido financiado en parte por el Ministerio de Ciencia e Innovación (Proyecto AGL2009-08859) y la Xunta de Galicia (Proyecto 08MMA018E).

Durante su realización la doctoranda ha disfrutado de un Contrato Predoctoral USC concedido por la Universidad de Santiago de Compostela.

Parte del trabajo realizado en la presente memoria ha sido galardonado con una

Mención Honorífica

en los **Premios de Investigación 2009** de la Real Academia Galega de Ciencias.

AGRADECIMIENTOS

... Y llegó la parte más difícil, la última en escribir y la que, muy probablemente, sea la primera en leer... Dice el refranero que “de bien nacidos es ser agradecidos”, así que a todos y cada uno de los que durante este tiempo me han apoyado y ayudado y han compartido tantos momentos, espero poder algún día devolver aunque sólo sea un poquito de todo lo que me han dado.

Gracias, mil gracias:

A las dos directoras de esta tesis:

A la Dra. Alicia Estévez Toranzo, un ejemplo a seguir y casi imposible de igualar. Su dirección ha sido un lujo y un honor y prometo hacer algún día una portada en azul.

A la Dra. Beatriz Magariños, directora y coautora de este trabajo, y que por culpa de esta tesis ha tenido que dejar de tomar café... Sólo puedo decir: gracias por todo.

Al Dr. Juan Luis Barja, por su constante interés y sus continuas aportaciones. Por ser nuestra wikipedia particular y por sus “juanadas”. Sin él este Departamento sería muchísimo más aburrido.

A la “jefa” Sol, por sus broncas, sus gritos y sus riñas (en el fondo siempre me gustaron, ya lo sabes, y reconoce que las echas de menos...). Porque sin ella yo no estaría hoy escribiendo esto.

A todos mis compañeros de trabajo, a los que están y los que ya no están, por todas las consultas, el coñazo que les he dado y por todos los cafés... La lista sería interminable (y no quiero olvidarme de ninguno), pero que sepáis que todos estáis en ella, los “de arriba” y los “de abajo”. Gracias también a las revisoras finales de esta tesis por su eficacia y rapidez.

A mis amigos de siempre: Rafa, Michi, Pablo, Poza, Gabi, Jose, María, Raquel ... porque a pesar de todo siguen estando ahí y saben que sigo estando aquí.

A toda mi familia del OTM, los que habéis estado, los que estáis y los que estaréis, porque habéis sido, sois y seréis partícipes y testigos de cómo se cumple un sueño. Porque, a pesar de todo lo malo, siempre habrá merecido la pena y siempre nos quedará el orgullo de haberlo hecho con nuestras propias manos.

A mis padres porque siempre han estado ahí cuando los he necesitado y gracias a ellos soy lo que soy (podíais haberos esmerado un poquito más, no?...). A mi familia, la de aquí y la de allá.

A Valera. Валера, мне никогда не хватит слов, чтобы сказать тебе как много ты значишь для меня. Спасибо тебе за терпение, за то, что ты выдерживаешь меня когда я бываю невыносима. Спасибо за то, что ты есть, ты - это лучшее, что было в моей жизни и только когда ты рядом всё приобретает смысл. Я тебе обещаю, что у нас всё получится. Я тебя люблю.

*“...Y lloró por toda la humanidad y por la frágil
belleza de los cuerpos de los que en tiempos se
habían desprendido, hacía millones de años.”*

Isaac Asimov (Sueños de Robot)

*“He disfrutado mucho con esta obra de teatro,
especialmente en el descanso.”*

Gruocho Marx

A mis padres y Valera

RESUMEN

Edwardsiella tarda es un patógeno bacteriano de la familia de las Enterobacterias que puede causar infección en distintos tipos de animales e incluso en humanos. Aunque su devastador efecto en los cultivos de peces ha sido descrito desde hace años, no ha sido hasta mediados de esta década cuando se ha convertido en uno de los patógenos más importantes en los cultivos de rodaballo en Europa causando graves pérdidas económicas en la industria acuícola.

En la presente tesis doctoral se ha realizado una amplia caracterización a nivel fenotípico, bioquímico, serológico y molecular de un conjunto de cepas de *E. tarda*, todas ellas aisladas de epizootias producidas en cultivos de rodaballo de diferentes áreas geográficas de Europa en los últimos años.

La caracterización bioquímica y fenotípica demostró que todas las cepas de *E. tarda* forman un grupo muy homogéneo, independientemente de su origen geográfico y hospedador. El análisis de ácidos grasos reveló también una alta homogeneidad para todas las cepas de *E. tarda*, aunque se comprobó que el medio de cultivo y la temperatura de incubación pueden influir en la composición de ácidos grasos. A nivel serológico sí pudieron establecerse diferencias dentro de la especie, constituyendo los aislados de rodaballo un grupo independiente del resto de aislados de *E. tarda* procedentes de otros hospedadores.

En cuanto a la caracterización molecular, a pesar de que todos los aislados de *E. tarda* de rodaballo mostraron un alta homogeneidad, se pudieron encontrar pequeñas diferencias intraespecíficas empleando las técnicas RAPD y REP-PCR. Además, en todas las cepas de rodaballo se detectó la existencia de dos plásmidos, uno de 12 Kb, presente también en cepas procedentes de otros hospedadores, y otro de 2,5 Kb que parece ser específico de los aislados de rodaballo. Aunque mediante el análisis proteómico con la técnica MALDI-TOF no se pudieron establecer diferencias entre cepas en función de su hospedador, esta técnica puede ser una herramienta eficaz para la identificación de cepas de *E. tarda*.

Con respecto a las técnicas de diagnóstico de la enfermedad, se describieron dos protocolos de PCR, uno específico para *E. tarda* y otro de multiplex-PCR junto con *Tenacibaculum maritimum*, que resultaron altamente sensibles y específicos y aplicables tanto a nivel de laboratorio como de campo. También se evaluó un medio de cultivo selectivo-diferencial para el aislamiento de *E. tarda* resultando altamente eficaz para el diagnóstico de la edwardsielosis y que podría llegar a ser de gran utilidad en estudios epidemiológicos del patógeno.

Los estudios de patogenicidad demostraron que esta bacteria representa un grave riesgo para el rodaballo, debido a su alto grado de virulencia independientemente de la ruta de inoculación y temperatura empleadas, siendo también patógena para otras especies como el

lenguado y la lubina. Los aislados estudiados causaron también mortalidades en animales homeotermos (ratones), con el consecuente riesgo de salud pública que ello podría suponer. Además, los resultados obtenidos en la búsqueda de genes implicados en la virulencia y en los ensayos de correlación genotipo-virulencia y genotipo-fenotipo parecen indicar que determinadas enzimas de degradación e invasinas pueden jugar un papel importante en la patogénesis de la bacteria.

Por último, se desarrolló una vacuna adyuvantada con aceite no mineral la cual, administrada por vía intraperitoneal, confiere una tasa de protección frente a *E. tarda* en rodaballo superior al 90% durante, al menos, 6 meses.

ABSTRACT

Edwardsiella tarda is an enterobacterial pathogen which could cause infection in several animals and humans. Although its devastating effect in fish cultures was described since many years, at present *E. tarda* could be considered one important pathogens in turbot aquaculture, causing high economic losses.

In this doctoral disertation, we performed a phenotypic, biochemical, serological and molecular characterization of a group of *E. tarda* strains isolated in the last years from mortalities occurred in turbot cultures in different geographical areas of Europe. A collection of other *E. tarda* strains from different origins was also employed for comparative purposes.

Biochemical and phenotypic characterization demonstrated that all *E. tarda* strains constitute an homogeneous group, regardless of their geographical origin and host. Fatty acid analysis revealed a high homogeneity within *E. tarda* isolates. However, the results obtained showed that culture media and temperature of incubation could influence in the fatty acid composition of the strains. At serological level intraespecific diversity was observed. Turbot strains formed an unique and homogeneous group, different to all the other strains tested.

At molecular level, only little differences were observed when RAPD and REP-PCR were employed. Moreover, we observed the presence of two plasmids in all the turbot isolates. One of them (12 Kb) was present also in *E. tarda* strains from other origins, and the other one (2.5 Kb), seems to be specific from turbot strains. Although proteomic analysis with MALDI-TOF not established differences within *E. tarda* strains based on their host, this technique could be an useful tool for the identification of the isolates.

With regard to the diagnosis of the disease, two PCR protocols were described: one specific to *E. tarda* and a multiplex-PCR that could detect *E. tarda* and *T. maritimum*. Both of them resulted highly sensitive and specific and could be employed at laboratory and field levels. In addition, we evaluated a selective and differential culture media for the isolation of *E. tarda* that could be an useful tool in the diagnosis and epidemiological studies of the disease.

Pathogenicity studies demonstrated that this bacterium represents an important risk for turbot cultures due to its high degree of virulence regardless of the inoculation route and temperature employed. Strains studied could also cause mortalities in mammals (mice), which indicates that *E. tarda* could be a public health risk factor. Moreover, results obtained in the genotype/virulence and genotype/phenotype correlation studies indicated that degradation enzymes and invasines could play an important role in the pathogenesis of the bacterium.

Finally, we developed an adyuvanted vaccine which, administered via i.p., conferred to turbot cultures RPS values over 90 % during, at least, six months.

ВЫВОД

Edwardsiella tarda эта бактерия патогенника относится к семейству *Enterobacteriaceae*. Этот микроорганизм может заражать различные виды животных, включая людей. Хотя его разрушительный эффект в рыба-производстве был на известен многих лет, только в середине прошедшего десятилетия *E. tarda* становится одной из самых опасных заболеваний среди выращивания тюрбо (большой ромб, *Scophthalmus maximus*) в Европе перенося большие экономические потери.

В процессе докторской диссертации были сделаны, фенотипичные, биохимические, серологические и молекулярные характеристики штамм *E. tarda*. Все штамм *E. tarda* были изолированы, в результате множества гибели тюрбо по всей Европе.

Биохимические и фенотипические характеристики показали, что все штамм *E. tarda* формируют однородную группу, не зависимо ни от его географического положения, ни от группы рыб в которых они были обнаружены. Кислотный анализ жиров показал, высокую однородность для всех штаммы *E. tarda*, также подтвердилось, что, питательная среда и инкубационный период могут повлиять на состав кислотных жиров.

Молекулярная характеристика. Не смотря на то, что все изолированные штамм *E. tarda* тюрбо показали высокую однородность, удалось найти не большие различия. Применяя технику RAPD и REP-PCR, также во всех штамм тюрбо обнаружилось существование плазида, один в 12 Кб, находящейся также в штамм других видов рыб и другой, в 2.5 Кб, который скорей всего является специфической для штамм тюрбо. Хотя в технике MALDI-TOF не смогли установить разницу между штамм носителей, эта техника даёт хороший результат в идентификации штамм *E. tarda*.

С точки зрения техники диагностики заболеваний, проделаны два протокола PCR, первый специальный для *E. tarda* и второй MULTIPLEX-PCR с *Tenacibaculum maritimum*, эта техника оказалась очень чувствительная и специфична, их можно использовать как в лаборатории, так и в натуральной среде. Также анализ питательной среды ЕТ для *E. tarda* оказался очень эффективным для диагностики заболеваний и может быть полезным, для изучения эпидемиологии *E. tarda*.

Патогенные изучения показали, что бактерия представляет собой серьёзный риск для тюрбо, из-за высокой степени вирулентности не зависимо от вакцины и использования температур. Также будучи патогена для других видов, таких как камбала и койкан. Изолированные штамм *E. tarda* также вызывает смертность у млекопитающих (мышей), с последовательным риском

для жизни людей, можем предположить. Кроме того, полученные результаты в ходе поиска ген причастных к вирулентности и испытания корреляции генотип-вирулентность и генотип-фенотип нам показывают с большой вероятностью, что определённые ферменты деградируют инвазины и может играть серьёзную роль в развитии болезни.

Подводя итог, была разработана вакцина с помощью не натуральных масел, которая вводилась в брюшную полость. Эта вакцина имела больше 90% защиты от *E. tarda* как минимум 6 месяце.

ABREVIATURAS

AM: Agar Marino

AS: Agar Sangre

cel: célula

CFU: Unidades Formadoras de Colonias

h: horas

i.p.: intraperitoneal

FMM: Flexibacter Maritimus Medium

g: gramo

kg: kilogramo

l: litro

LD₅₀: Dosis Letal 50

min: minuto

ml: mililitro

N: normal

nm: nanómetros

° C: grados centígrados

OMP: Outer Membrane Protein

PBS: Phosphate Buffer Solution

RPS: Relative Percent Survival

s: segundos

SS: Solución Salina

SS-agar: *Salmonella-Shigella* Agar

Tm: tonelada

TMB: 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine

TSA-1: Trapticasa Soja Agar al 1% de ClNa

TSC-1: Tripticasa Soja Caldo al 1% de ClNa

v/v: volumen/volumen

µm: micrómetros

µl: microlitros

∞ INDICE ∞

∞ Sección 1: Antecedentes	1
∞ Sección 2: Objetivos	19
∞ Sección 3: Caracterización bioquímica y serológica de <i>E. tarda</i>	21
3.1.- Introducción	21
3.1.1.- Caracterización bioquímica	21
3.1.2.- Sensibilidad a agentes quimioterápicos	23
3.1.3.- Caracterización serológica	23
3.1.4.- Composición de ácidos grasos	24
3.2.- Materiales y Métodos	26
3.2.1.- Cepas empleadas en el estudio	26
3.2.2.- Caracterización bioquímica	30
3.2.3.- Sensibilidad a agentes quimioterápicos	30
3.2.4.- Caracterización serológica	31
3.2.5.- Análisis de ácidos grasos (FAME)	36
3.3.- Resultados	39
3.4.- Discusión	49
Anexo 1: “Characterization of <i>Edwardsiella tarda</i> strains isolated from turbot <i>Psetta maxima</i> (L.)” Journal of Fish Diseases (2006) 29: 541-547	53
∞ Sección 4: Caracterización molecular de <i>E. tarda</i>	61
4.1.- Introducción	61
4.1.1.- Análisis proteico	61
4.1.2.- Contenido plasmídico	61
4.1.3.- Aplicación de técnicas moleculares para la caracterización de <i>E. tarda</i>	62
4.2.- Material y Métodos	63
4.2.1.- Cepas bacterianas empleadas	63
4.2.2.- Análisis proteico: SDS-PAGE	63
4.2.3.- Análisis proteómico: MALDI-TOF	65
4.2.4.- Análisis del contenido plasmídico	67
4.2.5.- Extracción del DNA	67
4.2.6.- Técnicas de genotipado: RAPD-PCR, REP-PCR, ERIC-PCR, BOX-PCR	68
4.3.- Resultados	73
4.4.- Discusión	86
Anexo 2: “Intraspecific genetic diversity of <i>Edwardsiella tarda</i> strains from turbot” Diseases of Aquatic Organisms (2011) (doi: 10.3354/dao02363)	89

☞ Sección 5: Estudios de patogenicidad y factores de virulencia	109
5.1.- Introducción	109
5.1.1.- Estudios de virulencia previos en <i>E. tarda</i>	109
5.1.2.- Factores de virulencia descritos en <i>E. tarda</i>	109
5.2.- Material y Métodos	112
3.2.1.- Estudios de virulencia	112
3.2.2.- Detección de genes implicados en la patogénesis	115
5.3.- Resultados	120
5.4.- Discusión	130
 Anexo 3: “Pathogenic potential of <i>Edwardsiella tarda</i> strains isolated from turbot” Fish Pathology (2011) 46: 27-30	 135
 Anexo 4: “First description of <i>Edwardsiella tarda</i> in sole (<i>Solea senegalensis</i>)” Journal of Fish Diseases (2011) (Aceptado)	 139
 ☞ Sección 6: Técnicas de diagnóstico de la edwardsielosis	 151
6.1.- Introducción	151
6.1.1.- Diagnóstico tradicional	151
6.1.2.- Diagnóstico molecular	152
6.2.- Material y Métodos	155
6.2.1.- Evaluación de medios de cultivo	155
6.2.2.- Evaluación y desarrollo de un protocolo de PCR para detección de <i>E. tarda</i>	156
6.2.3.- Detección simultánea de <i>E. tarda</i> , <i>T. maritimum</i> y <i>Ph. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> .	162
6.3.- Resultados	168
6.4.- Discusión	182
 Anexo 5: “Evaluation of four polymerase chain reaction primer pairs for the detection of <i>Edwardsiella tarda</i> in turbot” Diseases of Aquatic Organism (2010) 90: 55-61	 187
 Anexo 6: “Evaluation of the selective and differential ET medium for the detection of <i>Edwardsiella tarda</i> in aquaculture systems” Letters in Applied Microbiology (2011) 53: 114-119.	 195

☞ Sección 7: Estudios de vacunación contra la edwardsielosis	201
7.1.- Introducción	201
7.1.1.- Aspectos generales de la prevención y control de la edwardsielosis	201
7.2.2.- Antecedentes de la vacunación contra la edwardsielosis	202
7.2.- Material y Métodos	205
7.2.1.- Desarrollo de la vacuna acuosa (bacterina)	205
7.2.2.- Desarrollo de la vacuna adyuvantada	206
7.2.3.- Evaluación de las formulaciones vacunales	206
7.3.- Resultados	201
7.4.- Discusión	215
Anexo 7: “Development of an effective <i>Edwardsiella tarda</i> vaccine for cultured turbot (<i>Scophthalmus maximus</i>)” Fish and Shellfish Immunology (2008) 25: 208-212	217
☞ Sección 8: Consideraciones finales	223
☞ Sección 9: Conclusiones	227
☞ Bibliografía	229

Sección 1

Antecedentes

1.- LA ACUICULTURA

A pesar de que la acuicultura abarca una gran variedad de actividades productivas, puede definirse como el cultivo de organismos acuáticos con técnicas encaminadas a hacer más eficiente su producción. La acuicultura tiene una historia de 4.000 años, pero ha sido desde hace 50 cuando se ha convertido en una actividad socioeconómica relevante, dando empleo actualmente a más de 12 millones de personas en el mundo.

En 2008, según datos de la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), la acuicultura mundial produjo 68,4 millones de Tm de productos acuáticos, frente a los 90,8 millones de Tm capturadas por barcos de pesca. Hoy en día, se estima que la producción de acuicultura habrá superado los 70 millones de Tm (Figura 1.1).

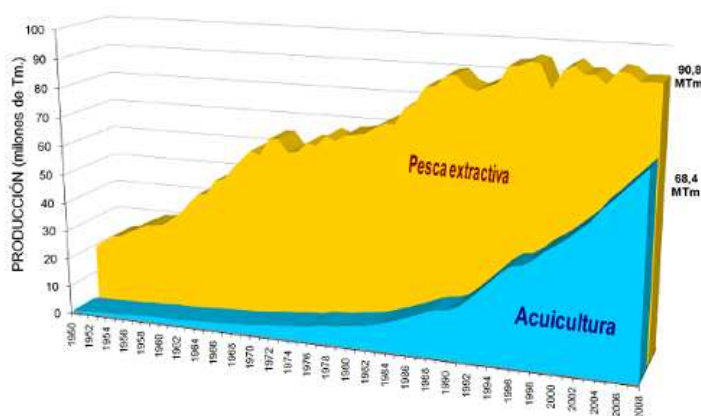


Figura 1.1.- Evolución de la producción pesquera (pesca extractiva y acuicultura) en el mundo en el período 1950-2008. Fuente: APROMAR 2010.

En las últimas décadas, la producción global de la acuicultura ha crecido de manera muy importante, pasando de 0,6 millones de Tm en 1950 (con un valor de menos de 400.000 €) a los mencionados 68,4 millones de Tm en 2008 (con un valor global de 84,7 mil millones de €). Con respecto a la producción acuícola por países, China es el principal país productor, con 42,6 millones de Tm de producción en 2008, mientras que España ocupa la posición 19ª con 249,1 mil Tm. En relación con el valor de la producción, China produce acuicultura por valor de 44831 millones de €, mientras que España ocupa el puesto 27ª con 414 millones de € (Tabla 1.1).

Casi la mitad (49,5%) de toda la producción mundial de la acuicultura en 2008 consistió en peces, pero el incremento de la producción ha tenido lugar en todos los grupos de especies. La producción de peces supuso el 50% del valor de la globalidad de la producción acuícola, los crustáceos el 7% y los moluscos el 19% (Figuras 1.2 y 1.3).

Tabla 1.1.- Principales países productores de acuicultura por toneladas y valor de producción anual (millones de €) en 2008. Fuente: APROMAR 2010

País	Producción en Tm	País	Producción en millones de €
China	42.669.744	China	44.831
Indonesia	3.854.844	India	4.034
India	3.478.692	Vietnam	3.694
Vietnam	2.497.400	Chile	3.639
Filipinas	2.407.698	Japón	3.264
Rep. de Corea	1.394.818	Indonesia	2.499
Tailandia	1.374.024	Noruega	2.495
Japón	1.187.774	Tailandia	1.762
Bangladesh	1.005.542	Filipinas	1.494
Chile	870.845	Bangladesh	1.413
TOTAL MUNDIAL	68.348.942	TOTAL MUNDIAL	84.791
España (19º)	249.074	España (27º)	414

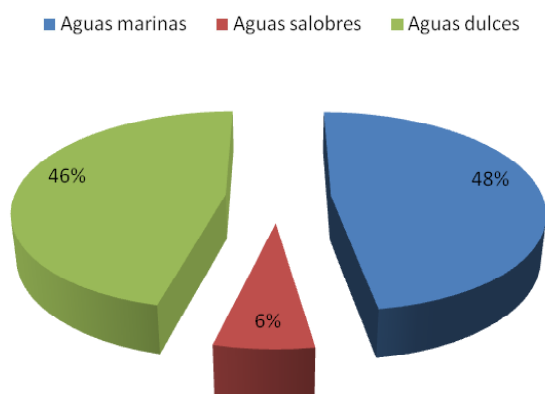


Figura 1.2.- Distribución porcentual de la producción mundial de la acuicultura (Tm) en 2008.

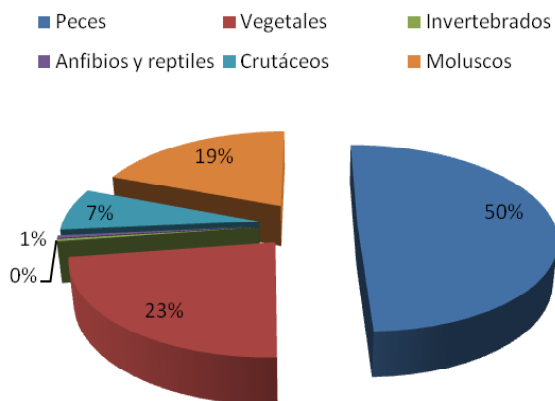


Figura 1.3.- Distribución porcentual de la producción mundial de la acuicultura (Tm) en 2008 según el tipo de producción.

La acuicultura es una fuente importante de pescado de calidad en Europa. Sin embargo, su importancia no es igual en todos los países de la Unión Europea (UE). En algunos, su relevancia económica y social supera ya a la de la pesca extractiva, como ocurre en España en algunas Comunidades Autónomas. Esta actividad desempeña un papel muy significativo en el desarrollo social y económico de determinadas zonas costeras, además de preservar la cultura marítima y pesquera de estas zonas. En Europa, los principales productos de la acuicultura son los pescados de alto valor comercial y los moluscos.

España es el Estado Miembro de la UE con una mayor producción en acuicultura, con 249070 Tm en 2008 (19.5% del total de la UE), seguido por Francia con 237870 Tm (18,6%) e Italia con 181470 Tm (14,2%). En relación con el valor de su producción acuícola, el Reino Unido es el principal Estado Miembro con 763.6 millones de € (20,1% del valor total), seguido por Francia e Italia con 651.2 millones de € (17,1%) y 648.3 millones de € (17,0%). El valor de la producción en España fue de 414 millones de € (10.9% del valor total).

2.- EL CULTIVO DEL RODABALLO

El rodaballo (*Scophthalmus maximus*) es una especie bentónica que en vida salvaje reposa sobre fondos arenosos, pedregosos o mixtos entre 20 y 75 metros de profundidad. Se distribuye por el Mar Báltico, Mar del Norte, Canal de la Mancha, Atlántico Nororiental hasta Marruecos y Mar Negro. En acuicultura, la producción se realiza en criaderos (“hatcheries”) en condiciones muy controladas. Durante su primer mes de vida se alimentan de organismos vivos: rotífero y artemia. Después, inician una alimentación a base de piensos fabricados con ingredientes principalmente marinos, como la harina de pescado.



Figura 1.4.- Rodaballo sobre un fondo arenoso.

La acuicultura del rodaballo comenzó en la década de los años 70 en Escocia (Reino Unido) y fue más tarde introducida en Francia y en España. En los primeros años, el número de instalaciones en España fue más bien limitado debido a la escasez de juveniles pero el desarrollo tecnológico de la producción de alevines favoreció la expansión del sector. A principios de la década de los años 90 ya había 16 productores en España; pero en 1992, a pesar de que el sector aumentó un 52% su producción, se produjo una crisis significativa en el cultivo de rodaballo que causó el cierre de algunas granjas debido principalmente a que la industria carecía de una red consolidada para la comercialización. Otro factor que contribuyó a esta crisis fue que las granjas eran pequeñas y tenían costos muy altos de producción. Desde ese momento, comenzó una reorganización del sector, la cual dio origen a un crecimiento tanto en producción como en el número de países donde se cultiva el rodaballo. España, con sus condiciones oceanográficas especialmente favorables, es ahora uno de los mayores productores del mundo, pero el rodaballo también se cultiva en Dinamarca, Alemania,

Islandia, Irlanda, Italia, Noruega, Gales (Reino Unido), Portugal y los Países Bajos. La distribución natural del rodaballo incluye las aguas costeras de todos estos países. El rodaballo también ha sido introducido en otras regiones como Chile a fines de los años ochenta y más recientemente, China, país que se estima que puede convertirse en el líder de producción mundial de esta especie, pero se desconocen los datos oficiales de producción.

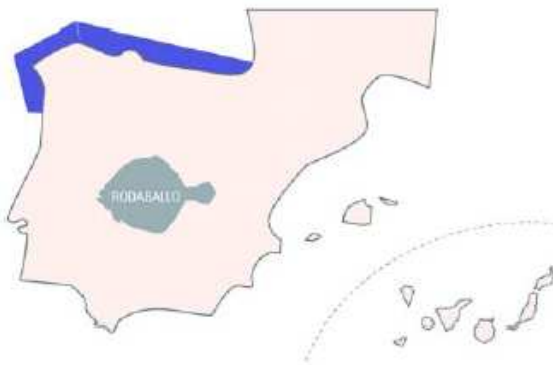


Figura 1.5.- Mapa de distribución de la producción de rodaballo en España.

La producción acuícola total de rodaballo en Europa en 2009 ha sido de 9246 Tm. Los principales países productores de rodaballo son España (83.3%), Portugal (5.8%) y Francia (5.7%). Producciones menores se dan en los otros países europeos (Apromar, 2010).

En España, la producción acuícola de rodaballo en 2009 ha sido de 8320 Tm, aumentando un 5,7% con respecto a la del 2008. Galicia es con un 97% del total de la producción española, con diferencia, la principal Comunidad Autónoma productora de rodaballo en España. Otras Comunidades productoras de rodaballo son Cantabria y el País Vasco.

3.- PRINCIPALES ENFERMEDADES BACTERIANAS EN EL CULTIVO DEL RODABALLO

Debido principalmente al carácter intensivo de los sistemas de producción acuícola que implica mantener en confinamiento altas densidades poblacionales, las enfermedades infecciosas de peces cultivados representan uno de los mayores factores de riesgo limitantes del éxito y viabilidad de la acuicultura por su elevada mortalidad y/o morbilidad (Toranzo y col., 2005). Se estima que no menos del 10% del total de los animales acuáticos cultivados en el mundo se pierden directamente como efecto de diversas enfermedades infecciosas ocasionadas por parásitos, bacterias, virus y hongos.

En el caso del rodaballo, hasta la actualidad han sido las enfermedades bacterianas las más comunes y las que producen mayores pérdidas económicas no sólo por las mortalidades que ocasionan, sino también por los gastos asociados al uso de agentes quimioterápicos y otras medidas de control. La importancia de estas pérdidas ha provocado el creciente interés por el estudio de las patologías, centrándose especialmente en la caracterización de los agentes causales a nivel taxonómico, fisiológico y molecular y en el estudio de mecanismos de virulencia (Toranzo y col., 2005). De igual forma, el sector acuícola ha tomado conciencia en los últimos años de la importancia del uso de vacunas para la prevención de enfermedades infecciosas, ya que supone una reducción del uso de quimioterápicos (Midtlyng, 2005).

- **Vibriosis:**

La vibriosis clásica, causada por *Vibrio anguillarum*, afecta a gran variedad de especies de peces, entre las que se encuentra el rodaballo. Los síntomas más típicos de la enfermedad son septicemias generalizadas en la base de las aletas, exoftalmia y los peces afectados presentan frecuentemente anorexia con palidez branquial, síntoma de una anemia severa. Aunque se han descrito en esta especie un total de 23 serotipos en función del antígeno somático "O" (Sørensen & Larsen, 1986) solamente los serotipos O1 y O2, y en mucho menor grado el O3, han sido asociados con mortalidades de peces. *V. anguillarum* se aísla fácilmente a partir de órganos internos de los peces afectados en medios generales suplementados con sal.

En los cultivos de rodaballo, la vibriosis causada por *V. anguillarum* representa un problema sólo en juveniles. En la actualidad existe una vacuna desarrollada por el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago que se aplica dentro del calendario



vacunal de las piscifactorías de forma rutinaria mediante dos baños con un intervalo de un mes entre ellos y cuando los peces tienen 1-2 g. Además, la enfermedad responde bien al tratamiento con oxitetraciclina (Toranzo & Barja, 1990).

Figura 1.6.- Alevín de rodaballo mostrando las típicas hemorragias producidas por *Vibrio anguillarum*.

- **Streptococosis:**

Es causada por un coco Gram positivo, *Streptococcus parauberis*, y ha sido el principal problema patológico del rodaballo desde el año 1993 a 1996 afectando a todos los tamaños de pez. Los síntomas externos más comunes de la enfermedad son la aparición de exoftalmia, con acúmulos de pus alrededor de los ojos y en la base de las aletas. El aislamiento de la bacteria se realiza en Agar Sangre, tanto a partir de lesiones externas como de órganos internos (Doménech y col., 1996).

A partir de 1996 comenzó a aplicarse una vacuna que, con una sola dosis administrada mediante inyección intraperitoneal, protegía al pez durante al menos dos años (todo el ciclo de crecimiento). Por tanto, aunque en la actualidad la bacteria puede permanecer endémica en plantas de cultivo, no causa mortalidad. La vacunación es la única forma de controlar la enfermedad, pues no responde a ningún agente quimioterápico "in vivo".



La vacunación es la única forma de controlar la enfermedad, pues no responde a ningún agente quimioterápico "in vivo".

Figura 1.7.- Las acumulaciones de material purulento alrededor de los ojos y en la base de las aletas son algunos de los síntomas externos de la estreptococosis en rodaballo.

- **Forunculosis:**

Causada por la bacteria Gram negativa, *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, la forunculosis es una de las enfermedades más antiguas conocidas en peces. En la actualidad, el patógeno presenta una distribución mundial afectando no sólo a salmónidos, a los que fue asociada en un primer momento, sino también a muchas otras especies de peces, entre ellas el rodaballo. La sintomatología más típica de la enfermedad en rodaballo es la aparición de espículas hemorrágicas en la zona dorsal de pez (Toranzo & Barja, 1992).

Las colonias de este microorganismo presentan un pigmento marrón difusible al medio de cultivo. El diagnóstico se puede realizar en base a pruebas bioquímicas o aglutinación en portaobjetos empleando antisuero específico. Las vacunas en rodaballo tienen una eficacia moderada y los quimioterápicos de elección son la oxitetraciclina o las quinolonas fluoradas, como



por ejemplo la enrofloxacin. Esta bacteria adquiere rápidamente resistencia a los quimioterápicos, por lo que es difícil su tratamiento.

Figura 1.8.- Entre los síntomas externos más característicos causados por *A. salmonicida* se encuentra la aparición de espículas hemorrágicas en la zona dorsal de los rodaballos.

- **Tenacibaculosis (antiguamente flexibacteriosis marina):**

Esta enfermedad, causada por la bacteria filamentosa Gram negativa, *Tenacibaculum maritimum*, es en la actualidad, uno de los principales problemas patológicos en el cultivo del rodaballo afectando a todas las edades de los peces. Fue descrita por primera vez en alevines de pargo japonés (*Pagrus major*) y besugo japonés (*Acanthopagrus schlegeli*) cultivados en Japón (Hikida y col., 1979). Posteriormente, ha sido aislada a partir de numerosas especies de peces y diversas áreas geográficas. Las lesiones ulcerativas sobre la superficie externa son el síntoma clínico más característico de la enfermedad (Avendaño y col., 2006).

El diagnóstico presuntivo de la enfermedad se basa en la observación de los signos clínicos en combinación con el examen microscópico de preparaciones en fresco obtenidas a partir de las lesiones. Para el aislamiento, es común la utilización del medio FMM (*Flexibacter maritimus* médium) (Pazos y col., 1996). Es difícil de tratar con quimioterápicos, pues aunque en un principio responde bien a la oxitetraciclina o quinolonas fluoradas, al cabo de unas semanas aparecen de nuevo mortalidades.

En la actualidad existe una vacuna comercial para rodaballo, elaborada frente al serotipo O2, y que se administra por inyección intraperitoneal en alevines de 20-30 g de peso.



Figura 1.9.- Rodaballo afectado por tenacibaculosis que muestra uno de los síntomas típicos de la enfermedad que se caracteriza por la erosión de las aletas y de la epidermis en la zona de la cabeza.

A pesar de todos los esfuerzos de investigación realizados hasta la actualidad en el estudio de estas enfermedades, la acuicultura intensiva ha llevado a que, una vez solventados unos problemas patológicos, surjan otras “nuevas” enfermedades. Estas patologías pueden ser causadas bien, por la aparición de un nuevo agente etiológico, por la aparición de un patógeno ya conocido en un nuevo hospedador, por la aparición de un nuevo serotipo o genogrupo de una especie ya descrita, o bien por la aparición de un patógeno conocido en una nueva área geográfica.

Hoy en día la enfermedad emergente de etiología bacteriana más importante en el cultivo del rodaballo es la edwardsielosis causada por *Edwardsiella tarda* que, en los últimos años, ha sido agente causal de graves mortalidades en los cultivos de esta importante especie comercial en Europa y, más recientemente, en China (Toranzo, 2007; Lan y col., 2008).

4.- ASPECTOS GENERALES SOBRE *Edwardsiella tarda*

4.1.- Historia, taxonomía y filogenia de la especie:

Actualmente, el género *Edwardsiella* está formado por tres especies bacterianas, dos de las cuales han sido descritas como causantes de graves infecciones en peces (*E. tarda* y *E. ictaluri*). Este género se incluyó dentro de la familia *Enterobacteriaceae* en base a sus características bioquímicas (Brenner, 1984), a la presencia del antígeno común a enterobacterias o “antígeno Kunin” (Makela y Mayer, 1976) y a la hibridación ADN-ADN con otros géneros pertenecientes a la familia (Brenner, 1977). Así, por definición, *Edwardsiella* pertenece al subgrupo 3 de la subclase γ de la clase *Proteobacteria* (superfamilia I).

A finales de la década de 1950, diversos grupos de investigadores se dedicaron de forma independiente al estudio de un grupo de cepas bacterianas, bacilos gram negativos, fermentativos, con características que los diferenciaban de los grupos descritos hasta el momento dentro de la familia de las Enterobacterias y que tenían diferentes fuentes de aislamiento:

En Japón, Sakazaki y Murata (1962) describían una colección de 256 cepas, la mayoría aisladas de serpientes, y que poseían características comunes como la formación de sulfuro de hidrógeno y el no fermentar manitol. Se denominó a este grupo de cepas “Grupo Asakusa”, en referencia a la clínica de Tokio donde habían sido originariamente aisladas.

En 1964, King y Adler publicaban un trabajo donde, por primera vez, se establecía una relación entre esta bacteria y una gastroenteritis humana. Ambos autores se refirieron a esta aún desconocida especie como el “Grupo Bartholemew” en referencia al lugar de Indiana donde esta cepa había sido aislada.

Poco después, Rakovsky y Aldova (1965) identificaron 3 cepas procedentes de Cuba y aisladas de heces como pertenecientes al “Grupo Bartholemew”, estando una de estas cepas asociada con un caso de diarrea en un bebé de 1 mes de edad.

Desde 1959 y durante estos mismos años el Centro de Prevención y Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) había estudiado, también, un grupo de cepas con características bioquímicas muy similares entre sí. Para denominar este grupo de aislados, se empleó el nombre “biotipo 1483-59” que, a diferencia de la colección japonesa, tenían en su mayoría origen humano.

En 1965, Ewing y col., propusieron la denominación *Edwardsiella tarda*, con el objetivo de reemplazar los nombres vernáculos que hasta entonces se venían empleando. El epíteto “tarda” hacía referencia a la relativa inactividad que esta especie presenta a la hora de fermentar carbohidratos.

La posición taxonómica de *E. tarda* fue confirmada por Brenner y col. (1974) en un estudio de hibridación DNA-DNA realizado en el Walter Reed Army Institute of Research (USA). Brenner demostró que *E. tarda* constituía un nuevo taxón dentro de la familia *Enterobacteriaceae*. Los resultados indicaban, en primer lugar, que la similitud entre *E. tarda* y *Escherichia coli* K-12 era solo de un 20% y, en segundo lugar, que todas las cepas estudiadas originarias de diferentes hospedadores y áreas geográficas formaban un único grupo altamente relacionado (88% de hibridación a 60°C). Además, mediante esta técnica se estableció que las cepas pertenecientes al grupo estudiado por Ewing y col. y las pertenecientes a los grupos Asakusa y Bartholomew, pertenecían a la misma especie: *E. tarda*.

En 1975, Sakazaki y Tamura modificaron el epíteto “tarda” por “anguillimortiferum” basándose en una publicación anterior en la que se proponía el nombre *Paracolobactrum anguillimortiferum* para un microorganismo aislado de anguilas (Hoshina, 1962). Esta bacteria poseía características bioquímicas idénticas a las de *E. tarda*, sin embargo, Hoshina no depositó una cepa tipo y el cultivo original se extravió. Ya que “anguillimortifeum” había sido publicado anteriormente, y por tanto tenía prioridad a nivel taxonómico sobre “tarda”, Sakazaki y Tamura, propusieron el nombre *E. anguillimortifera* (Hoshina) comb. nov. Un año más tarde, en 1976, Farmer y col., se basaron en el primer principio del Código Internacional de Nomenclatura Bacteriana para defender el epíteto “tarda” debido a su uso más extendido. Esta discrepancia fue resuelta en 1980 con la aprobación y publicación de la lista de nomenclatura bacteriana (Skerman y col., 1980) en la que

tanto *E. tarda* como *E. anguillimortifera* aparecen como sinónimos, siendo designada *E. tarda* como especie tipo.

Hasta 1980 este género, nombrado así en honor a P.R. Edwards por sus numerosas contribuciones al campo de la bacteriología entérica, estaba formado por una sola especie bacteriana, *Edwardsiella tarda*. Posteriormente, y en muy poco tiempo, se añadieron dos nuevas especies al género (Tabla 1.2).

Tabla 1.2.- Principales diferencias bioquímicas entre las especies del género *Edwardsiella*. + : más del 90% de las cepas con resultado positivo; - : menos del 10% de las cepas con resultado positivo; d : entre el 11% y el 89% de las cepas con resultado positivo.

TEST	<i>E. tarda</i>	<i>E. ictaluri</i>	<i>E. hoshinae</i>
Mobilidad a 37º C	+	- ¹	+
Utilización de malonato	-	-	+
Acidificación de glucosa con producción de gas	+	d ²	d
Producción de:			
Indol	+	-	d
H ₂ S	+	-	+
Ornitina decarboxilasa	+	d	+
Ácido de:			
D-manitol	-	-	+
Sacarosa	-	-	+
Trehalosa	-	-	+

¹ *E. ictaluri* es móvil a 25º C

² Resultado generalmente positivo a 25º C y negativo a 37º C.

En 1980 Grimont y col. publicaron datos de un grupo de cepas positivas para la utilización de malonato como única fuente de carbono y el manitol, aisladas de reptiles y aves y que propusieron llamar *Edwardsiella hoshinae*, en honor al bacteriólogo Toshikazu Hoshina. Hasta la fecha, la publicación de Grimont y col. es la única existente sobre *E. hoshinae*. Actualmente es poco lo que se conoce sobre el hábitat de esta especie, y los únicos organismos de los que ha sido aislada son los descritos en la publicación de Grimont y col. (lagartijas, frailecillos y flamencos).

En 1981, Hawke y col. describieron una tercera especie, *Edwardsiella ictaluri*, a partir de aislados de pez gato. Esta especie causa la enfermedad conocida como septicemia entérica del pez gato que provoca grandes pérdidas económicas en los cultivos de esta especie en Estados Unidos.

4.2.- Distribución geográfica y rango de hospedadores:

Desafortunadamente, son pocos los trabajos dirigidos al estudio de los hábitats naturales de *E. tarda*. Existen evidencias, sin embargo, de que los ambientes acuáticos y las especies animales que mantienen un contacto habitual con estos ambientes, pueden constituir el hábitat primario de *E. tarda*. Esta hipótesis se apoya en la escasa presencia natural de *E. tarda* en el tracto gastrointestinal de humanos y en los numerosos trabajos que describen el aislamiento e identificación de *E. tarda* a partir de mamíferos, aves, reptiles, peces y anfibios (Janda & Abbott, 1993a) (Tabla 1.3). *E. tarda* puede también afectar a humanos, aunque las infecciones por este microorganismo en el hombre son menos frecuentes. La mayoría de los casos están asociados a gastroenteritis debidas a la manipulación o consumo de pescado crudo o poco cocinado. También han sido descritos casos asociados al contacto con animales exóticos portadores de la bacteria y casos de septicemias causadas por *E. tarda* en personas inmunodeprimidas (Janda & Abbott, 1993a, 2006).

Tabla 1.3.- Grupos de organismos descritos como portadores de *E. tarda*.

TIPO DE HOSPEDADOR	Referencia
Reptiles (serpientes, tortugas, cocodrilos, lagartijas,...)	Wallace y col., 1966 Kalina y col., 1981
Anfibios (ranas, sapos,...)	Sakazaki & Tamura, 1991 Janda & Abbott, 1998
Aves (águilas, garzas, pelícanos, gaviotas, buitres,	White y col., 1969, 1973 Janda & Abbott, 1998
Peces (anguila, pez gato, platija ...)	Hoshina, 1962 Janda & Abott, 1993a
Ganado (cerdos, ganado vacuno, ...)	Ewing y col., 1965 Arambulo y col., 1967
Mamíferos marinos	Coles y col., 1978
Humanos	Koshi & Lalitha, 1976 Janda & Abbott, 2006

Mientras que el otro miembro del género *Edwardsiella*, *E. ictaluri*, se restringe mayoritariamente a ambientes de agua dulce estando asociada principalmente a infecciones en ictalúridos, *E. tarda* posee un amplio rango de hospedadores, tanto de agua dulce como de agua salada (Tabla 1.4). Aunque inicialmente la mayoría de las infecciones por *E. tarda* se describieron en anguila y platija en Asia, esta enfermedad se ha extendido a nivel mundial, considerándose en la actualidad un microorganismo ubicuo. Existen también descripciones del aislamiento de *E. tarda* a partir de aguas de cultivo y sedimentos (Wyatt y col., 1979; Yamada & Wakabayashi, 1999). Determinados factores ambientales de estrés, como las altas temperaturas, la baja calidad del agua o la elevada carga de materia orgánica, pueden contribuir a la aparición y severidad de las infecciones causadas por *E. tarda* en los peces (Plumb, 1999). *E. tarda* es capaz de sobrevivir fuera del hospedador en el agua de cultivo y en los sedimentos de los tanques, pudiendo actuar como reservorios ciertos organismos acuáticos.

Tabla 1.4.- Primeras descripciones por orden cronológico de infecciones por *E. tarda* en diversas especies de peces.

ESPECIE		REFERENCIA
Anguila japonesa	<i>Anguilla japonica</i>	Hoshina, 1962
Sargo púrpura	<i>Evynnis japonica</i>	Hoshina, 1962
Perca americana	<i>Micropterus salmoides</i>	White y col., 1973
Pez gato/bagre de canal	<i>Ictalurus punctatus</i>	Meyer & Bullock, 1973
Mújel o mújil	<i>Mugil cephalus</i>	Kusuda y col., 1976
Tilapia	<i>Oreochromis niloticus</i>	Aoki & Kitao, 1981
Salmón real/salmón chinook	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Amandi y col., 1982
Seriola	<i>Seriola gaingui</i>	Yasunaga y col., 1982
Pargo japonés	<i>Pagrus major</i>	Yasunaga y col., 1982
Platija/falso halibut del Japón	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Nakatsugawa, 1983
Betta	<i>Betta splendens</i>	Vladik y col., 1983
Carpa común o europea	<i>Cyprinus carpio</i>	Sae-Oui y col., 1984
Salmón atlántico	<i>Salmo salar</i>	Martin, 1984
Lubina rayada/lubina americana	<i>Morone saxatilis</i>	Herman & Bullock, 1986
Tilapia negra/tilapia de Java	<i>Oreochromis mossambicus</i>	Bragg, 1988
Góbido de arena	<i>Oxyeleotris marmoratus</i>	Supamataya, 1988
Anguila australiana	<i>Anguilla reinhardtii</i>	Eaves y col., 1990
Pez gato africano	<i>Clarias batrachus</i>	Sahoo y col., 1998
Trucha fontinalis	<i>Salvelinus fontinalis</i>	Uhland y col., 2000
Perca trepadora	<i>Anabas testudineus</i>	Sahoo y col., 2000
Pez sapo	<i>Opsanus tau</i>	Horenstein y col., 2004
Anguila europea	<i>Anguilla anguilla</i>	Esteve y col., 2006
Rodaballo	<i>Scophthalmus maximus</i>	Nougayrede y col., 1994 Castro y col., 2006
Anguila de pantano	<i>Monopterus albus</i>	Najiah y col., 2006

4.3.- Patología de la enfermedad:

Los síntomas clínicos de la septicemia causada por *E. tarda* difieren ligeramente entre las especies de peces en las que ha sido descrita.

En pez gato, *E. tarda* produce inicialmente pequeñas lesiones cutáneas (1-5 mm) que se localizan dorsolateralmente en el músculo (Meyer & Bullock, 1973). Estas pequeñas lesiones aumentan a grandes abscesos necróticos dentro del músculo lateral o el pedúnculo caudal, donde forman áreas inflamadas y visibles y la piel pierde su pigmentación. Las lesiones en el músculo, que contienen grandes cantidades de tejido necrótico, emiten un olor pútrido cuando se cortan. Cuando la infección progresa, ocasiona pérdida de movilidad del pez en la región caudal del cuerpo y una anemia generalizada similar a lo que ocurre con otras septicemias bacterianas.

Las anguilas con infección aguda de *E. tarda* desarrollan severas septicemias, con hemorragias en las aletas o petequias hemorrágicas en varias zonas del cuerpo y necrosis en el músculo. La región anal aparece inflamada y hemorrágica e, internamente, existe una anemia general en el peritoneo. En otras especies de peces se han descrito una gran variedad de síntomas clínicos. Por ejemplo, *E. tarda* causa exoftalmia y cataratas en tilapia así como abscesos en órganos internos (Kubota y col., 1981). La platija japonesa, infectada con *E. tarda*, desarrolla lesiones ulcerativas con pérdida de piel, que deja al descubierto el músculo, y hemorragias en aletas. La perca negra o perca americana (*Micropterus salmoides*) desarrolla lesiones necróticas en el pedúnculo caudal.

En las primeras descripciones de *E. tarda* en rodaballo (Nougayrede y col., 1994) los peces infectados presentaban decoloraciones en la zona dorsal, pequeñas lesiones ulcerosas en la piel con tumefacciones alrededor de los ojos y hemorragias en la boca y la base de las aletas. Ventralmente, en muchos casos, se podía observar hemorragias o petequias generalizadas a nivel muscular. Internamente, se detectó abundante líquido ascítico que producía distensión abdominal así como presencia de hemorragias en hígado, riñón y otros órganos internos.

De forma general se puede decir que los peces afectados por la enfermedad presentan natación errática y la boca y los opérculos abiertos lo que pudiera ser debido a la falta de oxígeno

característica del desarrollo de la anemia. Otros síntomas típicos son lesiones cutáneas, branquias blanquecinas, tumefacciones a nivel de los ojos, excesiva secreción de mucus, erosión de las escamas y úlceras. En casos agudos puede existir también inflamación y hemorragias a nivel anal, e inflamación a nivel de la cavidad ventral. Cuando la enfermedad progresa, pueden aparecer úlceras a nivel muscular que acaban por formar graves heridas en las que se acumula gas y que causa la aparición de un olor desagradable. Sin embargo, debido a que todos estos síntomas suelen aparecer también en otros casos de patologías debidas a otros agentes bacterianos, no son de mucha ayuda en el diagnóstico de la enfermedad.

4.4.- La edwardsielosis en rodaballo:

La primera descripción de edwardsielosis en rodaballo fue publicada por Nougayrede y col. en 1994. En su trabajo, describieron una epizootia ocurrida en otoño de 1993 en una planta de cultivo situada en la costa atlántica de la Bahía de Vizcaya y con una temperatura del agua entre 14º y 16º C. La sintomatología común a todos los peces se caracterizaba por pequeñas úlceras en la piel, tumefacciones alrededor de los ojos y hemorragias en la boca y base de las aletas. El abdomen se encontraba distendido debido a la gran cantidad de líquido ascítico e internamente el riñón y la musculatura presentaban abundantes petequias. *Edwardsiella tarda* fue identificada como el agente causal de esta septicemia.

Tras esta primera descripción, no volvieron a publicarse casos de infecciones en rodaballo causadas por esta bacteria hasta una década después. Fue a finales del año 2004 y principios del 2005 cuando comenzaron a producirse en distintas áreas geográficas de Europa brotes repetitivos de edwardsielosis y que provocaron altas mortalidades (Castro y col., 2006). El impacto causado por esta nueva enfermedad emergente en la industria acuícola del rodaballo fue en estos años especialmente importante.

Paralelamente a estos episodios de mortalidad ocurridos en Europa, *E. tarda* también fue causante de infecciones de rodaballo cultivado en la costa noreste de China. La mayor parte de estas mortalidades se produjeron entre primavera y verano de 2006 (Lan y col., 2008; Xiao y col., 2009) y, a diferencia de las cepas de origen europeo que mostraban una alta homogeneidad fenotípica siendo

todas ellas móviles, se detectaron en China cepas inmóviles carentes de flagelo capaces de provocar mortalidades en el rodaballo.

Sección 2

Objetivos

2.- OBJETIVOS

Dada la creciente importancia que en los últimos años ha adquirido el patógeno de peces *E. tarda* en la acuicultura europea, una correcta y amplia caracterización de los aislados desde el punto de vista bioquímico, serológico y molecular así como la realización de un estudio genético de la variabilidad intraespecífica, permitirán un mejor conocimiento del patógeno, además de aportar información vital a la hora del desarrollo de futuros estudios epidemiológicos de la enfermedad y del desarrollo de medidas de prevención y control. La determinación del potencial patógeno y un mayor conocimiento de los factores de virulencia implicados en la patogénesis de las cepas de *E. tarda* aisladas de rodaballo ayudarán a determinar hasta qué punto estos aislados son realmente un factor de riesgo para la acuicultura y/o la salud pública. Además, como en cualquier otra patología, la disponibilidad de técnicas de diagnóstico rápidas y eficaces que permitan un diagnóstico de la edwardsielosis en el menor tiempo posible, contribuirán a la prevención, tratamiento y control de la enfermedad, además de a minimizar las pérdidas provocadas por esta especie bacteriana.

Para la realización de la presente tesis doctoral se plantearon los siguientes objetivos:

- 1) **Caracterizar los aislados de *E. tarda* procedentes de rodaballo desde el punto de vista bioquímico y serológico así como de su contenido en ácidos grasos.**
- 2) **Realizar una completa caracterización molecular de este grupo de aislados y determinar la posible variabilidad genética intraespecífica.**
- 3) **Determinar el potencial patogénico de las cepas de *E. tarda*, así como llevar a cabo unos estudios preliminares para de la determinación de posibles factores de virulencia implicados en la patogénesis de la especie.**
- 4) **Poner a punto técnicas de detección de *E. tarda* sensibles y específicas para un rápido diagnóstico de la enfermedad.**
- 5) **Desarrollar una estrategia de vacunación con el fin de proteger a los cultivos de rodaballo frente a la edwardsielosis durante períodos prolongados de tiempo.**

Sección 3

Caracterización bioquímica y serológica de E. tarda

3.1.- INTRODUCCIÓN

3.1.1.- Caracterización bioquímica:

E. tarda es una especie bacteriana perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Entre sus principales características destacan el ser una bacteria Gram negativa, de forma bacilar, con un tamaño aproximado de 1 μm de diámetro y 2-3 μm de largo (Farmer y McWhorter, 1984). Es generalmente móvil (aunque existen cepas no móviles) mediante flagelos peritricos, anaerobio facultativo, catalasa positivo y oxidasa negativo.

Las características fenotípicas y bioquímicas útiles para la identificación de *E. tarda* han sido descritas ampliamente por diversos autores (ver Tabla 1.2, Sección 1, pag. 12) (Tabla 3.1). En general, *E. tarda* es una especie bioquímicamente muy homogénea, encontrándose solamente algunas variaciones en los resultados obtenidos para la utilización del citrato (Wei y col., 2008)

Tras las primeras descripciones, en las que la mayoría de los estudios mostraban la existencia de una gran homogeneidad a nivel bioquímico entre los aislados de *E. tarda*, Grimont y col. (1980) describieron un nuevo biogrupo dentro de la especie, que denominaron biogrupo I y que estaba formado por cepas que producían ácido a partir de L-arabinosa, D-manitol y sacarosa (pruebas negativas para las cepas “clásicas”) y no reducían tetrionato ni producían H_2S (pruebas positivas para las cepas “clásicas”).

Farmer y McWhorter (1984) describieron ambos biotipos denominando “salvaje” al integrado por cepas de *E. tarda* que presentaban las características “clásicas” y que eran más comunes que las cepas del biogrupo I.

Más recientemente, Walton y col. (1993) y Leung (1996) realizaron descripciones de cepas de *E. tarda* sacarosa positivas y L-arabinosa negativas, lo que parece indicar la existencia de un segundo biogrupo dentro de la especie (Tabla 3.2).

Tabla 3.1.- Características bioquímicas típicas de *E. tarda*. Datos extraídos de Mohanty & Sahoo (2007); Najiah y col. (2006); Baya y col., (1997).

CARACTER	Resultado	CARACTER	Resultado
Citocromo oxidasa	-		
Catalasa	+	Producción de ácido de:	
Movilidad		Glucosa	+
25°C	+	Lactosa	-
37°C	+	Sacarosa	-
Indol	+	Manitol	-
Rojo Metilo	+	Dulcitol	-
Citrato de Simmons	-	Salicina	-
Citrato de Christensen	+	Adonitol	-
Producción de H ₂ S	+	Inositol	-
Mol % G+C en ADN	55-58	Sorbitol	-
Voges-Proskauer	-	Arabinosa	-
Fenilalanina desaminasa	-	Rafinosa	-
Lisina Decarboxilasa	+	Ramnosa	-
Ornitina Decarboxilasa	+	Maltosa	+
Arginina Dehidrolasa	-	Xilosa	-
Oxidación/fermentación de glucosa	F	Trehalosa	-
Ureasa	-	Celobiosa	-
Salicina	-	Eritritol	-
Desoxiribonucleasa	-	Manosa	-
Hidrólisis de pectato	-	Glicerol	+
Beta galactosidasa	-	Melibiosa	-
Hidrólisis de almidón	+	Arabitol	-
Producción de gas a partir de glucosa	+	Galactosa	-
Citrato (KP)	+	Amigdalina	-
d-Tartrato (KP)	+		
KCN	-	Degradación de:	
Reducción de nitratos	+	Gelatina	-
β-galactosidasa	-	Caseina	-
TSI (triple sugar iron agar)	K/A Gas SH ₂	Elastina	-
Rango de temperaturas de crecimiento (°C)	10-42	Tween 20, 40 y 80	-
Tolerancia a NaCl (%)	0-4	Lecitina	-
		DNA	-
Utilización de:		Esculina	-
Acido malónico	-	Almidón	+
Glicina	-		
Malonato	-		
Acetato	-		

F: fermentativo; K: alcalino; A: ácido

Tabla 3.2.- Principales diferencias entre los biogrupos de *E. tarda* descritos hasta la actualidad.

TEST	<i>E. tarda</i> biogrupo salvaje	<i>E. tarda</i> biogrupo 1	<i>E. tarda</i> biogrupo 2
H ₂ S (TSI)	+	- ¹	- ¹
Acido de:			
L-arabinosa	-	+	-
D-manitol	-	+	-
Sacarosa	-	+	+

¹ En el medio TSI, la acidificación de la sacarosa conduce a la producción de grandes cantidades de ácido que disuelven el precipitado de sulfuro de hierro.

3.1.2.- Sensibilidad a quimioterápicos:

De forma general *E. tarda* es susceptible a la mayoría de los agentes quimioterápicos que se usan comúnmente para tratar enfermedades en acuicultura así como las infecciones sistémicas del aparato gastrointestinal en humanos (Reinhardt y col., 1985; Clark y col., 1991; Reger y col., 1993; Castro et al., 2006). Como tratamiento en acuicultura, Meyer & Bullock (1973) recomendaron el uso de 55 mg de oxitetraciclina/ kg peso de pez y día durante 10 días.

3.1.3.- Caracterización serológica:

Los primeros estudios serológicos de *E. tarda* fueron realizados de forma independiente por Sakazaki (1967) y McWhorter y col. (1967) en Japón y Estados Unidos respectivamente. El esquema antigénico de Sakazaki fue elaborado a partir de 256 cepas y estaba compuesto por 17 grupos en base al antígeno O y 11 grupos en base al antígeno flagelar H. Por su parte, McWhorter y col. (1967) presentaron un esquema provisional de 49 antígenos O y 37 antígenos H. Posteriormente, Tamura y col. (1988) fusionaron estos dos sistemas de serotipado de *E. tarda* proponiendo un nuevo esquema que consta 61 antígenos somáticos (O) y 45 flagelares (H).

Park y col. (1983) emplearon la técnica de aglutinación del antígeno O en un trabajo que estudiaba 445 aislados procedentes de plantas de cultivo de anguila para clasificar las cepas en cuatro serotipos distintos (A, B, C y D). De los aislados de riñón, el 72% pertenecían al serotipo A, indicando que éste podría ser el tipo predominante y el que causa enfermedad en estos peces. Rashid y col. (1994) realizaron también estudios similares en platija, encontrando los tres primeros serotipos descritos por Park (A, B y C) y comprobando de nuevo que el serotipo más virulento era el A.

Si bien los resultados obtenidos por Park y col., (1983) y Rashid y col (1994) parecen indicar que no existe una asociación entre serotipo y hospedador, y que un mismo serotipo de *E. tarda* es capaz de infectar a distintas especies de peces, se hacen necesarios mayores estudios que permitan establecer un claro esquema de serotipado dentro de *E. tarda* y, en especial, en las cepas aisladas de peces.

3.1.4.- Composición de ácidos grasos de *E. tarda*:

Hasta la fecha solamente existe una publicación de Panangala y col. (2006) en la que se empleó cromatografía de gases para determinar la composición de ácidos grasos de cepas de *E. tarda* y *E. ictaluri*. Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que los principales ácidos grasos presentes en *E. tarda* son los que se muestran en la tabla 3.3.

Los tres ácidos grasos más abundantes en *E. tarda* resultaron ser el ácido tetradecanoico (16:0), el ácido hexadecanoico (16:1 *cis*) y el ácido octadecanoico (18:1 *cis*) que son conocidos por ser los ácidos grasos mayoritarios en las membranas de la mayoría de las bacterias Gram negativas (Stead, 1992). Por otra parte, ácidos grasos como ciclopropanos y ácidos grasos hidroxilados, se encuentra también presentes en *E. tarda* y son conocidos por ser integrantes comunes de las membranas de enterobacterias (Grogan & Cronan Jr, 1997).

En su trabajo, Panangala y col., también encontraron que *E. tarda* resultaba mucho más homogénea en cuanto a su composición de ácidos grasos que *E. ictaluri*, presentando todos los

aislados de *E. tarda* estudiados (la mayor parte de ellos procedentes de Norte América y agua dulce) un índice de similitud entre ellos superior al 96%.

Tabla 3.3.- Principales ácidos grasos presentes en *E. tarda* (Panangala y col., 2006)

ÁCIDO GRASO	NOMBRE	NOMBRE COMÚN
Ácidos grasos saturados		
14:0	Acido tetradecanoico	Acido mirístico
16:0	Acido hexadecanoico	Acido palmítico
18:0	Acido octadecanoico	Acido esteárico
Ácidos grasos insaturados		
18:1 ω 7 <i>cis</i>	cis-7- ácido octadecanoico	-
18:1 ω 9 <i>cis</i>	cis-9- ácido octadecanoico	Acido oleico
Ácidos grasos cíclopropanos		
17:0 Δ	cis-9,10- ácido metil hexadecanoico	Análogo al ácido margárico
19:0 Δ ω 8 <i>cis</i>	cis-8- ácido metil octadecanoico	Análogo al ácido lactobacílico
SF*		
SF-2 = 14:0 3-OH	3-ácido hidroxitetradecanoico	3-ácido hidroximirístico
16:1 iso I	Acido hexadecanoico, isómero I	-
SF-3 = 15:0 iso 2-OH	2-ácido hidroxipentadecanoico	-
16:1 <i>cis</i> 7	<i>cis</i> -7-ácido hexadecanoico	Acido palmitoleico
SF-6 = 18:0 anteiso	Acido anteisononadecanoico	-
18:2 <i>cis</i> 6, <i>cis</i> 9	Acido octadecatrienoico	Acido linolenico

* SF (Summed Feature) representa dos picos con tiempos de retención solapados.

3.2.- MATERIALES Y METODOS

3.2.1.- Cepas empleadas en el estudio:

Las cepas de *E. tarda* utilizadas en este trabajo, fueron aisladas a partir de epizootias repetitivas ocurridas en distintas plantas de cultivo de rodaballo durante el período 2004-2010. Todas estas plantas de cultivo se encuentran situadas en distintas áreas geográficas de Europa, localizándose unas en el Norte de Europa (códigos HL) y otras en el Sur de Europa (códigos ACC, RBR, RM y ACR) (Tabla 3.4). No se observó una distribución estacional en la aparición de las mortalidades, estando éstas repartidas a lo largo de todo el año.

Tabla 3.4.- Epizootias causadas por *Edwardsiella tarda* en cultivos de rodaballo durante los años 2004 a 2010.

SUR DE EUROPA			NORTE DE EUROPA		
Año	Nº epizootias	Nº cepas	Año	Nº epizootias	Nº cepas
2005	1	3	2004	1	1
2006	4	16	2005	2	6
2008	2	8	2006	4	21
2009	5	18			
2010	1	2			

Los peces muestreados presentaban una sintomatología común en todos los casos, en la que podemos destacar (ver Figura 3.1a y 3.1b):

- Zonas despigmentadas y blanquecinas en la parte dorsal del pez, tanto en cabeza como en el resto del cuerpo.
- Zona ventral hemorrágica, con petequias en la musculatura.
- Exoftalmia y/o tumefacciones en los ojos.
- Abundante líquido ascítico en la cavidad abdominal.
- Órganos internos hemorrágicos: riñón, hígado, ...



Figura 3.1a.- Lesiones externas en rodaballo típicas de *E. tarda* en la zona dorsal, zonas decoloradas en la piel, ojos con tumefacciones y bocas hemorrágicas.



Figura 3.1b.- Lesiones externas en rodaballo típicas de *E. tarda* en la zona ventral, zonas hemorrágicas y/o con abundantes petequias.

En el presente trabajo se incluyeron un total de 75 aislados de *E. tarda* procedentes de diferentes plantas de cultivo situadas en distintas zonas de la geografía Europea (Tabla 3.5). Estos aislados de rodaballo, se obtuvieron de peces de diferentes tamaños, (desde 12 hasta 500 g) y cultivados en distintos sistemas de producción.

Además, y con fines comparativos, se incluyeron también un total de 17 cepas de *E. tarda* de distintos orígenes geográficos y de hospedador (Tabla 3.6).

Tabla 3.5.- Cepas de *Edwardsiella tarda* aisladas de rodaballo empleadas en este estudio. El sombreado indica cepas aisladas de un mismo brote de mortalidad.

CEPA	AÑO	ORIGEN	CEPA	AÑO	ORIGEN
HL1.1	2004	Norte Europa	RM296.1	2006	Sur Europa
ACC 35.1	2005	Sur Europa	RM297.1	2006	Sur Europa
ACC 36.1	2005	Sur Europa	RM298.1	2006	Sur Europa
ACC 36.2	2005	Sur Europa	RM299.1	2006	Sur Europa
HL8.1	2005	Norte Europa	RM300.1	2006	Sur Europa
HL9.1	2005	Norte Europa	RM301.1	2006	Sur Europa
HL10.1	2005	Norte Europa	RBR7.1	2008	Sur Europa
HL12.1	2005	Norte Europa	RBR8.1	2008	Sur Europa
HL13.1	2005	Norte Europa	RBR9.1	2008	Sur Europa
HL14.1	2005	Norte Europa	RBR10.1	2008	Sur Europa
HL21.2	2006	Norte Europa	RBR11.1	2008	Sur Europa
HL21.3	2006	Norte Europa	RBR12.1	2008	Sur Europa
HL23.1	2006	Norte Europa	RBR13.1	2008	Sur Europa
HL24.1	2006	Norte Europa	RBR14.1	2008	Sur Europa
HL25.1	2006	Norte Europa	ACC121.1	2009	Sur Europa
HL26.1	2006	Norte Europa	ACR326.1	2009	Sur Europa
HL27.1	2006	Norte Europa	ACR327.1	2009	Sur Europa
HL28.1	2006	Norte Europa	ACR328.1	2009	Sur Europa
HL29.1	2006	Norte Europa	ACR329.1	2009	Sur Europa
HL30.1	2006	Norte Europa	ACR333.1	2009	Sur Europa
HL31.1	2006	Norte Europa	ACR342.1	2009	Sur Europa
HL32.1	2006	Norte Europa	ACR243.1	2009	Sur Europa
HL33.1	2006	Norte Europa	ACR345.1	2009	Sur Europa
HL34.1	2006	Norte Europa	ACR352.1	2009	Sur Europa
HL35.1	2006	Norte Europa	ACR352.2	2009	Sur Europa
HL36.1	2006	Norte Europa	ACR354.1	2009	Sur Europa
HL37.1	2006	Norte Europa	ACR355.1	2009	Sur Europa
HL38.1	2006	Norte Europa	ACR356.1	2009	Sur Europa
HL42.1	2006	Norte Europa	ACR357.1	2009	Sur Europa
HL43.1	2006	Norte Europa	ACR358.1	2009	Sur Europa
HL46.1	2006	Norte Europa	ACR359.1	2009	Sur Europa
ACC51.1	2006	Sur Europa	ACR361.1	2009	Sur Europa
ACC52.1	2006	Sur Europa	ACR1.1-10	2010	Sur Europa
ACC53.1	2006	Sur Europa	ACR2.1-10	2010	Sur Europa
ACC69.1	2006	Sur Europa			
ACC70.1	2006	Sur Europa			
RM288.1	2006	Sur Europa			
RM289.1	2006	Sur Europa			
RM290.1	2006	Sur Europa			
RM293.1	2006	Sur Europa			
RM294.1	2006	Sur Europa			

Tabla 3.6.- Otras cepas de *E. tarda* empleadas en este estudio con fines comparativos. T. Aoki, Faculty of Agriculture, Miyazaki University (Miyazaki, Japan); A. Baya, Animal Health Diagnostic Laboratory, (Maryland, USA); CECT: Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, España).; R. Cipriano, USGS/National Fish Health Research Laboratory (Kearneysville, USA); T. Matsuyama, National Research Institute of Aquaculture Fisheries Research Agency (Mie, Japón); H. Motoki, Osaka University (Osaka, Japón); NCIMB: National Collection of Marine and Industrial Bacteria (Aberdeen, UK); T. Uribe, Fundación Chile (Puerto Montt, Chile); T. Wellborn, Mississippi Cooperative Extension Service, Mississippi State University (Jackson, Mississippi, USA).

CEPA	HOSPEDADOR	PAIS	FUENTE
81.48	Pez Gato (<i>Ictalurus punctatus</i>)	USA	T. Wellborn
KGE 7901	Tilapia (<i>Tilapia nilotica</i>)	Japón	T. Aoki
07BS	Tilapia (<i>Tilapia nilotica</i>)	Japón	H. Motoki
205/03	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	España	Colección Laboratorio
FL3-22	Pez ángel (<i>Pterophyllum scalare</i>)	USA	A. Baya
EDK 1	Anguila (<i>Anguilla japonica</i>)	Japón	T. Aoki
E-11-2	Anguila (<i>Anguilla japonica</i>)	Japón	T. Aoki
9.8	Lubina americana (<i>Morone saxatilis</i>)	USA	R. Cipriano
FL4-53-4K	Lubina americana (<i>Morone saxatilis</i>)	USA	A. Baya
WFE 1	Platija (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	Japón	T. Matsuyama
WFE 10	Platija (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	Japón	T. Matsuyama
ET 001	Besugo (<i>Pagellus bogaraveo</i>)	Japón	T. Matsuyama
ET 006	Besugo (<i>Pagellus bogaraveo</i>)	Japón	T. Matsuyama
ET 009	Besugo (<i>Pagellus bogaraveo</i>)	Japón	T. Matsuyama
FP 176-99	Salmon del Pacífico (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	Chile	T. Uribe
NCIMB2034	Especie de pez sin determinar	NCIMB	NCIMB
CECT849	Heces de humanos	CECT	CECT

Las cepas de *E. tarda* se cultivaron de forma rutinaria en el medio Tripticasa de Soja Agar (Pronadisa) suplementado con un 1% de NaCl (TSA-1). La incubación se realizó a 25°C durante 24 h. La conservación de las cepas se llevó a cabo empleando viales comerciales Cryo-billes (AES Laboratory, Francia), los cuales se someten a una congelación lenta mediante pases sucesivos a 4°C, -30°C y -80°C.

3.2.2.- Caracterización bioquímica:

Para la caracterización bioquímica de las cepas de *E. tarda* en base a pruebas bioquímicas convencionales, se emplearon métodos en tubo y en placa siguiendo los protocolos descritos por McFaddin (1983) y Amos (1985). Los tipos de pruebas realizadas se listan en la Tabla 3.7 (pag. 36)

Como complemento a las pruebas bioquímicas clásicas en tubo y placa, se utilizó también el sistema miniaturizado API20E (Biomerieux). Este sistema comercial es un sistema estandarizado que permite la identificación de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y otros bacilos Gram negativos no exigentes.

La inoculación de las galerías se realizó con suspensiones bacterianas en solución salina (0,85%) (SS) estéril, siguiendo las instrucciones de la casa comercial. La incubación se realizó a 25°C durante 24 h y se leyeron los resultados siguiendo las indicaciones del fabricante. Para la identificación de los aislados en base a los resultados del API se empleó la herramienta Apiweb (Biomerieux) que contiene todas las bases de datos de los sistemas comerciales API en constante actualización.

3.2.3.- Sensibilidad a agentes quimioterápicos:

Los patrones de resistencia de los distintos aislados a los agentes quimioterápicos utilizados normalmente en acuicultura se determinaron utilizando la técnica de difusión en placa, siguiendo las recomendaciones de la CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005). El medio empleado fue el Mueller-Hinton Agar suplementado con un 1% de NaCl (MHA-1). Las cepas se resuspendieron en Trypticase Soja Caldo suplementado con un 1% de NaCl (TSC-1) y se sembraron en césped con un hisopo estéril sobre las placas. Los agentes antimicrobianos utilizados fueron: Amoxicilina (25 µg), Enrofloxacin (5 µg), Florfenicol (30 µg), Oxitetraciclina (30 µg), Trimetropim-sulfametoxazol (25 µg) y Flumequina (30 µg). Tras el período de incubación (24 h a 25°C) se midieron los posibles halos de inhibición del crecimiento alrededor de los discos.

3.2.4.- Caracterización serológica:

La caracterización serológica de los aislados de *E. tarda* se llevó a cabo empleando cuatro técnicas serológicas distintas: aglutinación en portaobjetos, microtitulación, Dot Blot y Western Blot.

a) Preparación de los antígenos:

Dependiendo del ensayo serológico a realizar, se emplearon como antígenos bacterianos:

- ✓ **Células bacterianas enteras**, obtenidas mediante la suspensión de los cultivos frescos crecidos en placas de TSA-1 en SS (concentración aproximada de $1,2 \times 10^9$ cel/ml, ajustado visualmente al tubo nº 4 de la escala McFarland).
- ✓ **Antígenos Somáticos Termoestables** (antígenos "O"), obtenidos a partir de suspensiones celulares en SS por tratamiento con calor (100° C durante 1h).

Para obtener los antígenos "O", las cepas cultivadas en TSA-1 se resuspendieron en SS y se calentaron en un baño a 100°C durante 1 h. A continuación, las suspensiones de antígenos se centrifugaron a 2000 rpm durante 20 min y se retiró el sobrenadante. Finalmente, los precipitados se resuspendieron en un volumen igual de SS y se mantuvieron a 4°C hasta su uso.

- ✓ **Lipopolisacáridos** (LPS) obtenidos mediante incubación con Proteinasa K (Oxoid) de las suspensiones bacterianas.

La extracción de los LPS presentes en la membrana externa de la envoltura celular de los aislados se realizó utilizando el método de Hitchcock y Brown (1983). Las cepas se cultivaron en TSA-1 durante 24 horas, se resuspendieron en 1,5 ml de PBS y se lavaron 2 veces por centrifugación (12000 rpm durante 2 minutos). El precipitado celular se resuspendió en 200 µl de PBS y se hirvió a 100° C durante 10 minutos. Las muestras se enfriaron en hielo y, a continuación, se incubaron en el baño a 60°C durante 1 hora con una solución de Proteinasa K (2,5 mg/ml) en PBS y se almacenaron a -20° C hasta su uso.

b) Preparación y absorción de antisueros:

La obtención de antisueros para el serotipado de los aislados se llevó a cabo mediante inoculación en conejos de raza Neozelandesa de aproximadamente 2.5–3 kg siguiendo la metodología de Sørensen & Larsen (1986).

Las cepas de *E. tarda* seleccionadas como antígenos para la inmunización de los conejos fueron un representante de los aislados de rodaballo (ACC35.1) y una cepa aislada de lubina americana (9.8) y que se tomó como cepa de referencia (Baya y col., 1997). Las células bacterianas de ambas cepas (cultivos de 24 h en TSA-1) se inactivaron por adición de formol a una concentración final de 0.7% dejándolo actuar durante 2h a temperatura ambiente. Tras la eliminación del formol mediante centrifugación y lavados con SS, el precipitado celular se resuspendió en SS y se conservó a 4° C.

Previamente a la inoculación de los conejos, se les extrajo 5 ml de sangre a cada uno de ellos con el fin de disponer de un suero control no inmune y una semana después se comenzó a inyectar por vía intravenosa la suspensión de células bacterianas formolizadas, cuya dosis se incrementó a intervalos regulares de 3 días desde 0.2 ml (dosis inicial) hasta 1.0 ml (dosis final). Una semana después de la última inyección se extrajeron aproximadamente 30 ml de sangre a cada conejo para obtener antisuero. Al cabo de 2 semanas se repitió el protocolo de inmunización, siempre con dosis de 1 ml (dosis de recuerdo).

El proceso de extracción de sangre (por aplicación de cánulas en la vena marginal de la oreja) va seguido de la coagulación de la misma a temperatura ambiente (durante 1-2 h) y el mantenimiento a 4°C durante 12-14 h, momento en el que se separa el suero de los restantes componentes sanguíneos por centrifugación (1000 rpm, 10 min).

Para la absorción de los antisueros, alícuotas de los sueros obtenidos se absorbieron con suspensiones del antígeno somático termoestable de las cepas heterólogas siguiendo el protocolo descrito por Romalde y col. (1993). Así, el suero obtenido frente a la cepa 9.8 se absorbió con el antígeno de la cepa ACC35.1 y viceversa. Para ello, el antígeno "O" se mezcló con el suero heterólogo y la mezcla se incubó a 25°C durante 1h en agitación y a 4° C durante toda la noche. Posteriormente,

la mezcla se centrifugó a 8000 rpm durante 20 minutos y se recogió el sobrenadante o suero absorbido en un tubo nuevo. El proceso de absorción se repitió hasta eliminar las reacciones cruzadas. Los sueros absorbidos se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

c) Aglutinación en portaobjetos:

El ensayo de aglutinación en portaobjetos realizado según los procedimientos descritos por Toranzo y col. (1987), consiste básicamente en la mezcla, sobre un portaobjetos, de volúmenes iguales de suspensión antigénica y antisuero diluido 1/10. Solamente una aglutinación rápida y clara fue considerada como positiva. Los controles negativos se hicieron con SS y suero de conejo no inmunizado.

d) Microtitulación:

La técnica de microtitulación o aglutinación cuantitativa se llevó a cabo en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo en U (Corning) y usando safranina al 0,005% (p/v) en SS de acuerdo con la metodología descrita por Stevenson & Daly (1982). Para ello, se adicionaron 20 µl de SS más safranina a todos los pocillos que van a ser utilizados, excepto el primero de la fila. En el primer y segundo pocillos se añadieron 20 µl de una dilución 1/10 del suero en SS. A continuación, el contenido del segundo pocillo se mezcló con una micropipeta y se hicieron diluciones seriadas hasta el último pocillo. A todos los pocillos de la placa se le añadió a continuación 20 µl de la suspensión del antígeno "O". El título de aglutinación de cada antisuero fue definido como el recíproco de la mayor dilución de dicho suero que, después de un período de incubación de una noche a 15° C con el mismo volumen de antígeno bacteriano, dio lugar a una reacción de aglutinación positiva.

e) Dot Blot:

El ensayo "Dot Blot" se realizó siguiendo básicamente la metodología de Cipriano y col. (1985) con ligeras modificaciones (Bolinches y col., 1990).

Se llevó a cabo sobre membranas de ésteres de celulosa (Milipore), previamente humedecidas en PBS y secadas al aire, sobre las cuales se depositan las suspensiones antigénicas (1 μ l). Una vez bloqueados los grupos reactivos de las membranas con una solución de gelatina (Biorad) al 3% en tampón Tris-salino (TBS) (Tris-HCl 0.005 M, NaCl 0.2 M, pH 7.5) durante 1 h, se incubaron con el antisuero correspondiente diluido en TTBS {TBS [Tris 0.5M (Merck) suplementado con 1.5 M de NaCl (Merck) ajustado a pH 7.3] suplementado con 0.05% de Tween 20} durante 1h con agitación suave. Tras retirar la solución del anticuerpo primario, y realizar 3 lavados durante 5 min con TTBS, se procedió a incubar la membrana con el anticuerpo secundario de cabra anti-Inmunoglobulina G (IgG) de conejo conjugado con fosfatasa alcalina a una dilución 1:3000 en TBS durante 1 h.

Tras los lavados correspondientes con TTBS y TBS, las membranas se incubaron en la solución de revelado de tampón carbonato (0,1 M NaHCO₃, 1,0 mM MgCl₂, pH 9,8), 4-nitroazul de tetrazolium (0,3 mg/mL, Oxoid) y 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (0,15 mg/mL, Oxoid) hasta la aparición de color (5-10 min). El revelado se detuvo mediante sucesivos lavados con agua destilada. El ensayo fue realizado en su totalidad a temperatura ambiente.

La aparición de puntos azules nítidos sobre la membrana es indicativo de reacciones positivas, mientras que puntos ligeramente azulados se correspondieron con la presencia de reacciones cruzadas, que no deben confundirse con las positivas verdaderas.

f) Western blot:

Dado que los LPS han resultado ser excelentes inmunógenos en otras especies, hemos evaluado también la existencia de reacciones inmunológicas entre los lipopolisacáridos (LPS) de la envoltura celular de las distintas cepas.

Para ello, se llevaron a cabo ensayos de transferencia electroforética a membranas de nitrocelulosa de las preparaciones de LPS, seguido de la detección de antígenos empleando antisueros específicos ("Inmunoblot").

- Preparación de geles y condiciones de electroforesis:

La preparación de los geles y tampones para la electroforesis de las muestras de LPS se realizó siguiendo la técnica descrita por Laemmli (1970).

Los geles concentrador y separador se prepararon a partir de las soluciones stock I [30% (p/v) de acrilamida y 0,8 % (p/v) de N,N' bis-metilen-acrilamida] y II [44% (p/v) acrilamida y 0,8% (p/v)] de N,N' bis-metilen-acrilamida]. La composición final para el gel concentrador ("Stacking gel") fue 3% (p/v) acrilamida y 0,08% (p/v) bisacrilamida en tampón Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8 con dodecil-sulfato-sódico (SDS) al 0,1% (p/v). La composición final para el gel separador ("Resolving gel") fue 12,5% (p/v) de acrilamida y 0,22% (p/v) bisacrilamida en tampón Tris-HCl 0,375 M pH 8,8 con SDS al 0,2%. La polimerización de los geles se realizó por adición de TEMED (N,N,N'-tetrametil-etilendiamina) al 0,4% (v/v) para el gel concentrador y al 0,03% para el separador, y persulfato amónico al 0,02% (v/v) como agente catalizador. El tampón de electroforesis empleado fue Tris-glicina [Tris-(hidroximetil)-aminometano 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1% (p/v)]. Las electroforesis se llevaron a cabo en una cubeta vertical Mini Protean® (Bio-Rad), aplicando una corriente constante de 15 mA durante toda la noche.

El volumen de muestra analizada fue 15 µl, que fueron mezclados antes de cargar el gel con un volumen idéntico de tampón final de muestra FSB 2x [Tris-HCl 0,065M, ph 6,8, SDS 2% (p/v), glicerol 10% (v/v), azul de bromofenol 0,001% y 2-mercaptoetanol 5% (v/v)]. La mezcla se calentó en un baño a 100° C durante 5 min para finalmente cargar 20 µl de cada una de las muestras por pocillo. La electroforesis se llevó a cabo a 60 v durante 90 min.

- Análisis Inmunológico de los antígenos celulares:

Tras la electroforesis, la relación inmunológica de los LPS de las cepas de *E. tarda* se evaluó mediante transferencia electroforética a membranas de nitrocelulosa (técnica de "immunoblot" o "Western blot") de las muestras separadas en geles discontinuos de SDS-PAGE y usando los anticuerpos específicos mediante el procedimiento de Towbin y col. (1979). Para ello se utilizó una cubeta Mini Trans-Blot® (Bio-Rad) a 350 mA durante 1 h en tampón de transferencia compuesto por Tris-HCl 25 mM (pH 8,3), glicina 192 mM y metanol al 20% (v/v).

Finalizada la transferencia, se continuó con el procedimiento descrito en el ensayo de “Dot-Blot”. Cuando la reacción fue evidente se detuvo el revelado mediante baños de agua destilada.

3.2.5.- Análisis de Ácidos Grasos (FAME):

a) Composición de ácidos grasos de cepas de *E. tarda*:

La extracción de ácidos grasos de cada cepa en estudio se realizó de acuerdo con el procedimiento del sistema de identificación SHERLOCK (MIDI Newark, Del., USA). Para ello, se recogieron 40 mg (peso húmedo) de células crecidas en TSA a las 24 h. A continuación, y con el objetivo de lisar las células para liberar los ácidos grasos de los lípidos celulares, se efectuó una saponificación (alcohol metílico, 150 ml; hidróxido de sodio, 45 g y agua destilada desionizada, 150 ml). Para formar los metil ésteres de ácidos grasos (FAME), se realizó una metilación con ácido clorhídrico 6 N (325 ml) y alcohol metílico (275 ml) y, seguidamente, un proceso de extracción con n-hexano y metil terbutil eter (1:1) para transferir los FAME de la fase acuosa a la fase orgánica. El último paso fue un lavado con hidróxido de sodio (10.8 g) y agua destilada deionizada (900 ml).

El análisis de los ácidos grasos extraídos se realizó en un cromatógrafo Hewlett-Packard 6890 equipado con el software Sherlock Microbial Identification System 4,5 (MIDI Systems, USA). La composición en ácidos grasos fue calculada como porcentaje del área de pico en relación con la sumatoria de áreas de todos los ácidos grasos de C9 a C20. La nomenclatura adoptada para los ácidos grasos es: el número anterior a los dos puntos indica el número total de carbonos de la molécula, el número posterior indica el número de dobles enlaces, el número que sigue a ω (en caso de existir) indica el carbono inicial del doble enlace seguido de la palabra cis o trans para la correspondiente configuración, el número antes de la palabra metil indica la posición de éste y la indicación iso o anteiso indica la posición del metilo terminal o subterminal.

Además de un grupo representativo de 17 aislados de *E. tarda* de rodaballo y otras cepas de *E. tarda* de distintos orígenes (Tabla 3.6), se incluyeron también con fines comparativos en este análisis las otras dos especies que forman el género *Edwardsiella*: *E. ictaluri* (CECT885) y *E. hoshinae* (DSM13771).

Todos los análisis posteriores de los resultados, incluidos dendogramas, se realizaron empleando el software Sherlock Microbial Identification System 4,5 (MIDI Systems, USA).

b) Influencia de la temperatura y el medio de cultivo en la composición de ácidos grasos:

En los laboratorios de diagnóstico de cultivos marinos es habitual el uso del medio TSA-1 por ser un medio general que facilita el crecimiento de las bacterias marinas que requieren sal. El sistema de identificación Sherlock Microbial Identification System 4,5 cuenta con dos bases de datos en las que se encuentra recogida la especie *E. tarda*: TSBA6, que se emplea con cepas que han sido crecidas en medio TSA y CLIN6, que se emplea con cepas crecidas en agar sangre. Sabiendo que cada especie microbiana tiene una proporción de ácidos grasos y que dicha proporción varía en función de algunas variables como pueden ser el medio de cultivo, la temperatura de crecimiento o la edad fisiológica de la célula (Lechevalier, 1977; Scherer y col., 2003), en el presente apartado se estudió la influencia del medio de cultivo y la temperatura de incubación en la composición de los ácidos grasos de *E. tarda*. Para ello, se emplearon dos temperaturas de incubación diferentes (25º y 37º C) y en dos medios de cultivo distintos (TSA-1 y Agar Sangre).

Las cepas seleccionadas para este ensayo fueron: ACC35.1, ACC121.1, HL1.1, HL23.1, RM288.1, RBR7.1 y ACR326.1; todas ellas aisladas de rodaballo.

c) Identificación de *E. tarda* mediante el sistema software Sherlock Microbial Identification System 4,5:

El sistema de Identificación Sherlock Microbial Identification System 4,5 (MIDI Systems, USA) analiza la composición de ácidos grasos de un microorganismo y la compara con una base de datos interna de perfiles generada a partir de cepas de referencia. Una vez que una cepa bacteriana ha sido cultivada, procesada y analizada con el software Sherlock, el sistema de identificación compara su perfil de ácidos grasos con la base de datos y genera una lista de posibles especies en base a un índice de similaridad. Siguiendo las recomendaciones de la casa comercial, se consideró como adecuados índices con valores de 0.500 o superiores y una diferencia mayor de 0.100 entre la

primera y segunda opción de identificación. Si el valor del índice se encontraba entre 0.300 y 0.500 y con una diferencia mayor de 0.100 con la segunda entrada, podría tratarse de una buena identificación, pero con una composición de ácidos grasos ligeramente diferente al perfil de la base de datos (cepa atípica). Aquellos valores menores de 0.300 indicarían que no existe esa especie en la base de datos del software.

3.3.- RESULTADOS

3.3.1.- Caracterización bioquímica e identificación de las cepas:

Los resultados obtenidos demostraron una elevada homogeneidad a nivel bioquímico entre las 75 cepas aisladas de rodaballo estudiadas, independientemente de su origen geográfico y fuente de aislamiento (Tabla 3.7), con la única excepción de la capacidad de las cepas para crecer utilizando como única fuente de carbono el citrato en el medio de Simmons. Los resultados obtenidos, permitieron identificar los aislados de rodaballo como *Edwardsiella tarda*.

Tabla 3.7.- Características bioquímicas de *E. tarda* obtenidas empleando 75 aislados de rodaballo (ver Tabla 3.5, pag 28) y 17 cepas de diferentes fuentes de aislamiento (ver Tabla 3.6, pag. 29).

CARÁCTER	RESULTADO	CARÁCTER	RESULTADO
Morfología	b	Crecimiento a distintas temepaturas	
Movilidad	+	4º C	-
Gram	-	15 º C	+
Oxidasa	-	37 º C	+
Crecimiento en TCBS	-	42 º C	+
Catalasa	+	60 º C	-
Arginina dehidrolase	-		
Lisine decarboxilasa	+	Crecimiento a distintas concentraciones de	
Ornitina dihidrolasa	+	CINa	
O/F	F	0 %	+
Urea	-	3 %	+
Indol	+	5 %	-
VP	-	8 %	-
Gelatina	-	10 %	-
Amilasa	-		
Esculina	-		
Citrato de Simmons	v		
Nitrato	+		
Gas glucosa	+		
Lipasa	-		
Lactosa	+		
Kliger	K/A Gas y H ₂ S		

B: bacilo; F: fermentativo; V: resultado variable; ; K: alcalino; A: ácido

La caracterización mediante los sistemas miniaturizados API 20E, confirmó la identificación de todos los aislados como *E. tarda*, mostrando la mayoría de ellos el perfil 4544000 (identificación según la base de datos del sistema API 20E del 99,9%) exceptuando algunos casos que producían resultados variables para la prueba del citrato en los que el perfil resultante era 4744000 (identificación 99,4%) (Figura 3.2).



Figura 3.2.- Sistema miniaturizado API 20E correspondiente al perfil 4544000 de *E. tarda*.

3.3.2.- Sensibilidad a agentes quimioterápicos:

De forma general, la mayoría de cepas resultaron ser sensibles a los agentes estudiados, obteniéndose solamente resistencias en el caso de la cepa aislada de pez ángel (ver Tabla 3.8). Los aislados de rodaballo resultaron sensibles a todos los agentes, excepto en el caso de la Amoxicilina, donde se encontraron algunas cepas resistentes.

Tabla 3.8.- Resultados de los estudios de sensibilidad a antibióticos y agentes quimioterápicos para varias de las cepas de *E. tarda* estudiadas en función de la fuente de aislamiento. +: 100% de cepas sensibles al agente quimioterápico; -: todas las cepas resistentes al agente quimioterápico; v: resultados variables, entre paréntesis porcentaje de cepas sensibles al agente quimioterápico.

Aislados	Nº de cepas	AML 25	ENR 5	FFC 30	OT 30	SXT 25	UB 30
Rodaballo	75	V(50)	+	+	+	+	+
Anguila	2	+	+	+	+	+	+
Pez ángel	1	-	+	+	-	-	+
Pez gato	1	+	+	+	+	+	+
Lubina americana	2	+	+	+	+	+	+
Tilapia	2	v(50)	+	+	+	+	+
NCBM2034	1	+	+	+	+	+	+

AML: amoxicilina; ENR: enrofloxacina; FFC: florfenicol; OT: oxitetraciclina; SXT: trimetropim-sulfametoxazol; UB: flumequina

3.3.3.- Caracterización serológica:**a) Aglutinación en portaobjetos:**

El análisis serológico mediante aglutinación en portaobjetos utilizando, tanto las suspensiones bacterianas de células enteras como los antígenos "O" extraídos de cada una de las cepas utilizadas en el estudio, mostró que todas las cepas producían reacción positiva con los dos antisueros utilizados (tanto el obtenido frente a la cepa ACC35.1 procedente de rodaballo como el obtenido frente a la cepa 9.8 procedente de lubina americana) independientemente de hospedador y del lugar del que fueran aisladas.

b) Microtitulación:

Los resultados de los ensayos de microtitulación por aglutinación en placas de 96 pocillos usando los antisueros no absorbidos permitieron agrupar las cepas de *E. tarda* en dos grupos diferenciados en función de los valores de microtitulación obtenidos frente a los dos antisueros empleados. El Grupo 1 comprendería todos los aislados de *E. tarda* procedentes de rodaballo, los cuales mostraron valores de titulación altos (entre 160 y 640) frente al antisuero de rodaballo y valores de titulación bajos frente al antisuero de lubina americana (menores o iguales a 80). El Grupo 2 estaba formado por el total de los 17 aislados incluidos en el estudio con fines comparativos, los cuales no mostraron reacción positiva frente al antisuero de rodaballo (títulos menores de 10) y reaccionaron con títulos entre 80 y 640 frente al antisuero de la cepa 9.8 (Tabla 3.9).

Tabla 3.9.- Resultados de las pruebas de microtitulación, ensayos Dot-Blot y análisis de “inmunoblot”. ++, reacción positiva fuerte; +, reacción positiva; (+), reacción positiva débil; -, reacción negativa; (), antígeno utilizado para absorber el antisuero.

Cepas por hospedador	Microtitulación		Dot Blot			Western Blot	
	Suero anti-		Suero anti-			Suero anti-	
	ACC35.1	9.8	ACC35.1	9.8	9.8 (ACC35.1)	ACC35.1	9.8
Rodaballo (75)^a	160-640	40-80	++	(+)	-	++	-
Lubina americana (2)	<10	320-640	-	++	++	-	++
Platija (2)	<10	640	-	(+)	-	-	-
Besugo (3)	<10	640	-	(+)	-	-	-
Pez Gato (1)	<10	80	-	(+)	-	-	-
Tilapia (2)	<10	160	-	++	+	-	-
Anguila japonesa (2)	<10	160	-	++	+	-	-
Dorada (1)	<10	80	-	(+)	-	-	-
NCIMB 2034 (1)	<10	80	-	(+)	-	-	-
Salmón Pacífico (1)	<10	80	-	(+)	-	-	-
Pez ángel (1)	<10	80	-	(+)	-	-	-
CECT849 (1)	<10	80	-	(+)	-	-	-

^a Entre paréntesis número de cepas aisladas de cada hospedador

c) Dot Blot:

Los ensayos Dot-Blot mostraron una reacción fuerte y clara entre los antígenos “O” de las cepas aisladas de rodaballo y su suero homólogo (ACC35.1). Sin embargo, ningún otro antígeno reaccionaba con este antisuero (Tabla 3.9 y Figura 3.3a).

Por otra parte, cuando el antisuero empleado era el procedente de la cepa aislada de lubina americana (9.8), se observaba una fuerte reacción frente al antígeno extraído de la cepa homóloga, y una ligera reacción positiva con algunas otras cepas, entre las que se encontraban las aisladas de rodaballo (Tabla 3.9 y Figura 3.3b). Para eliminar esta reacción cruzada, se realizó un nuevo ensayo Dot-Blot empleando esta vez, el suero de la cepa 9.8 absorbido con el antígeno de la cepa ACC35.1. Los resultados obtenidos mostraron que las reacciones cruzadas desaparecían en el caso de todos los

aislados de rodaballo, así como en la mayoría de las cepas procedentes de otros hospedadores (Tabla 3.9 y Figura 3.3c).

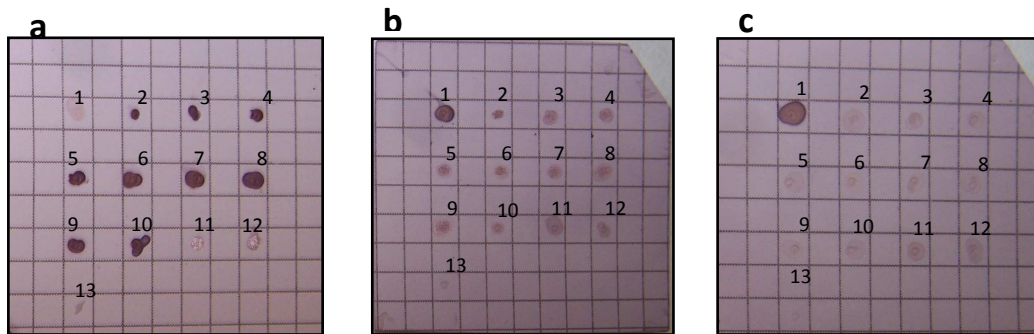


Figura 3.3.- Ensayo Dot Blot emplando el antisuero obtenido frente a la cepa aislada de rodaballo ACC35.1 (a), el antisuero no absorbido 9.8 (b) y el antisuero 9.8 absorbido con el antígeno ACC35.1 (c). Antígenos: 1, 9.8; 2 al 10, aislados de rodaballo; 11, NCIMB 2034; 12, aislado de anguila; 13, PBS.

c) Western Blot:

El análisis Inmunoblot de LPS demostró claramente que todos los aislados de rodaballo, independientemente de su origen geográfico, constituyen un grupo homogéneo desde el punto de vista serológico, mostrando todos ellos una fuerte y clara reacción frente al antisuero de la cepa de rodaballo ACC35.1 (Tabla 3.9 y Figura 3.4a). Ninguno de los restantes LPS extraídos de las otras cepas mostró reacción positiva. En este ensayo no fue necesario emplear antisueros absorbidos, ya que no se apreció ninguna reacción cruzada entre los LPS extraídos y los dos sueros empleados. Así, cuando el suero empleado para realizar el ensayo Western Blot fue el obtenido frente a la cepa 9.8, únicamente los LPS extraídos de la cepa homóloga mostraron reacción positiva (Tabla 3.9 y Figura 3.4b).

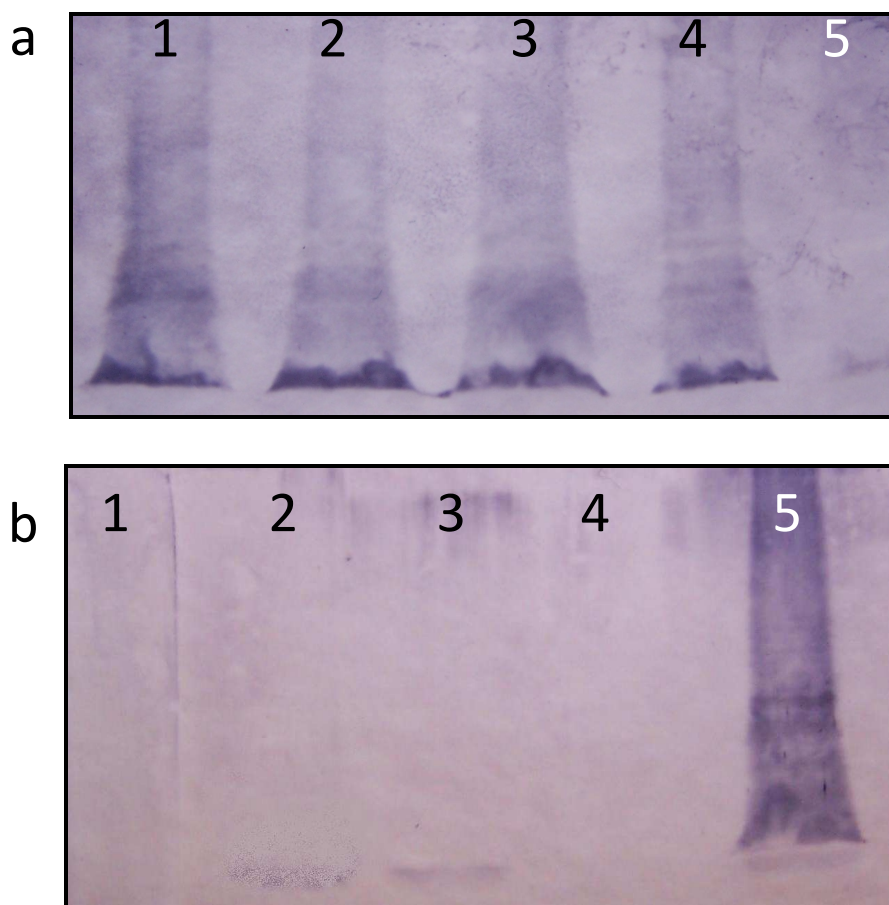


Figura 3.4.- Ensayo Western Blot de LPS extraídos de las cepas de *E. tarda* empleando los antisueros sin absorber (a) de la cepa de rodaballo ACC 35.1 y (b) de la cepa de lubina americana 9.8. LPS: 1 al 4, aislados de rodaballo y 5, aislado de lubina americana 9.8.

3.3.4.- Análisis de ácidos grasos (FAME):

a) Composición de ácidos grasos de *E. tarda*:

El perfil de ácidos grasos originado mediante el análisis FAME fue muy similar para todas las cepas de *E. tarda* (Figura 3.5). Se detectaron un total de 7 ácidos grasos en un porcentaje mayor al 1% pertenecientes a las categorías de ácidos grasos saturados, insaturados y ciclopropanos. Entre ellos, los más abundantes fueron el 14:0 (ácido tetradecanoico o ácido mirístico), el 16:0 (ácido hexadecanoico o ácido palmítico), el 17:0 Δ (análogo al ácido margárico), el 19:0 Δ w8c (análogo al ácido lactobacílico) y los denominados SF2, SF3 y SF8 (“Summed Feature”), que corresponden a dos picos que muestran valores de retención que se solapan y que representan, por tanto, a dos o más ácidos grasos. También pudieron detectarse algunos otros ácidos grasos en determinados aislados, pero siempre en concentraciones traza (menores al 1%), como es el caso del 12:0 (ácido dodecanoico o ácido láurico).

Con los datos obtenidos para todas las cepas estudiadas, se elaboró un dendograma (Figura 3.6) donde se pueden apreciar las similitudes entre distintas cepas de *E. tarda* según su perfil de ácidos grasos.

Así, podemos observar que a pesar de que todas las cepas de *E. tarda*, independientemente de su origen, presentan una composición similar en cuanto a sus principales ácidos grasos, se forma un grupo bien diferenciado y muy homogéneo integrado solamente por todos los aislados de rodaballo. El resto de aislados de *E. tarda* y las cepas de referencia de *E. hoshinae* y *E. ictaluri*, se encuentran más alejados del grupo de cepas de rodaballo y con mayores distancias entre ellas.

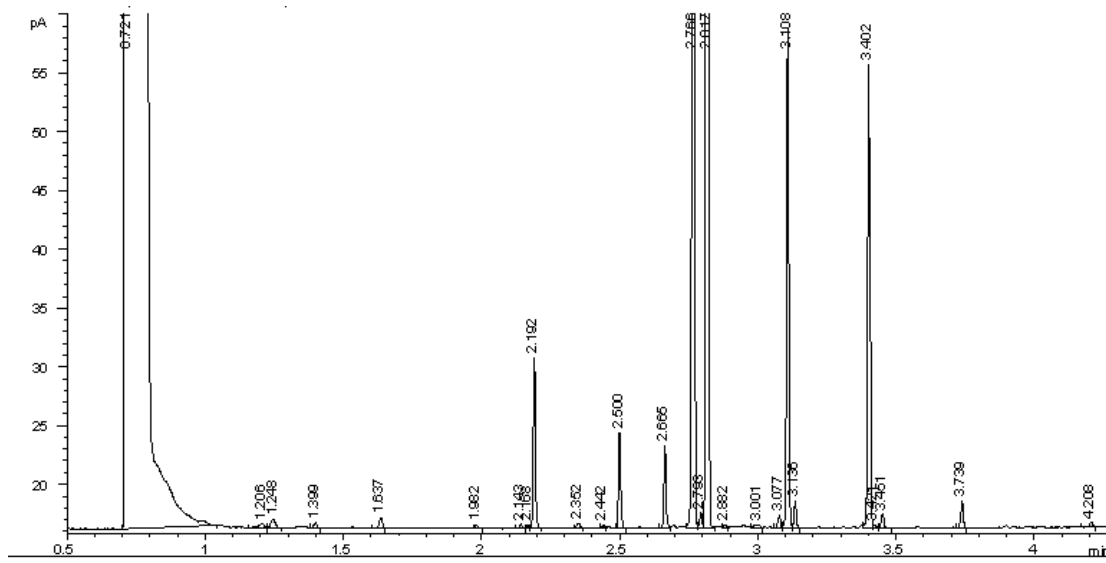


Figura 3.5.- Perfil de ácidos grasos correspondiente a la cepa de *E. tarda* aislada de rodaballo ACC35.1.

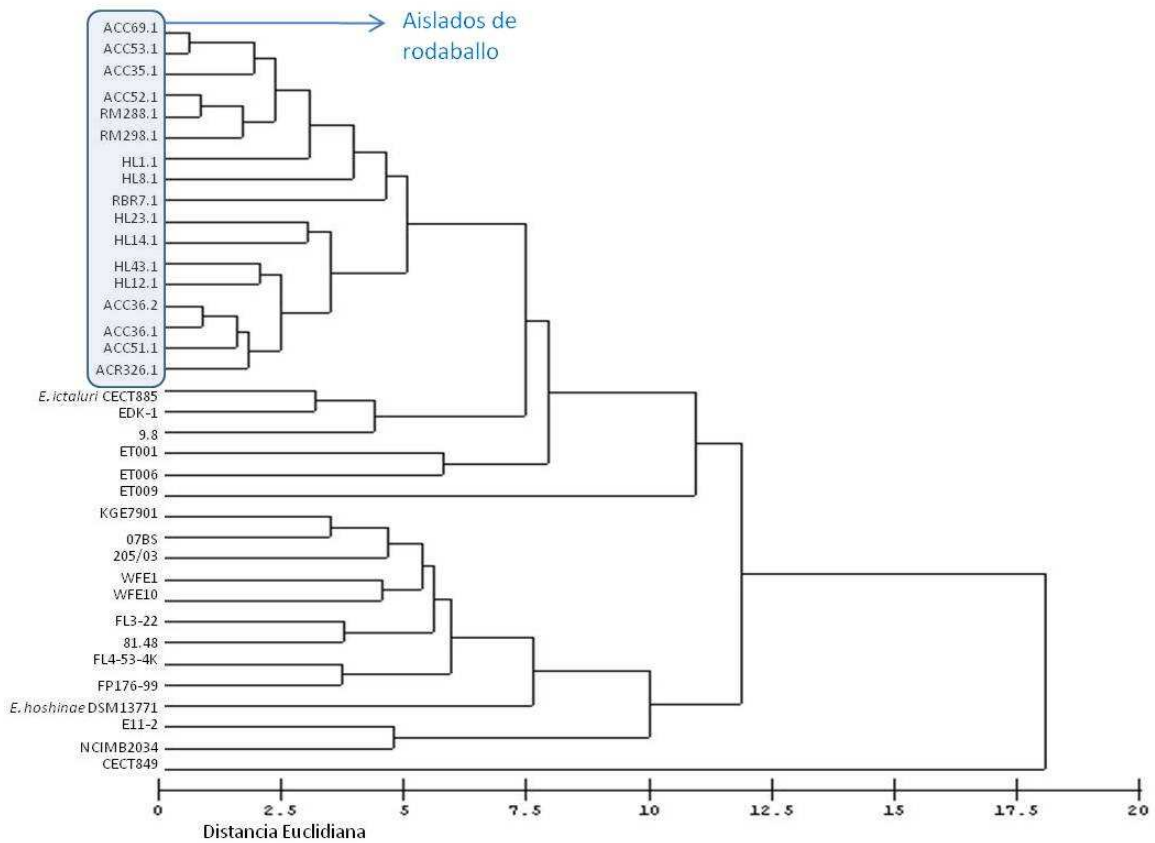


Figura 3.6.- Dendrograma representativo obtenido en base al análisis de los ácidos grasos.

b) Influencia de la temperatura y el medio de cultivo en la composición de ácidos grasos:

En cuanto a la influencia de la temperatura y el medio de cultivo en la composición de FAME en las siete cepas seleccionadas, los resultados obtenidos se pueden ver en la Tabla 3.10. En ella se indican la totalidad de los ácidos grasos detectados y, resaltados con fondo gris, los ácidos grasos mayoritarios (con porcentajes mayores al 1%) para cada una de las condiciones de cultivo.

Así, cuando las cepas se incubaron en TSA a 25° C (condiciones descritas en el apartado anterior), pudieron observarse un total de 7 ácidos grasos mayoritarios y la presencia de otros 5 en cantidades traza.

Cuando el medio empleado para el crecimiento de los aislados fue el TSA suplementado con sal (TSA-1) a 25° C, los resultados fueron muy similares a los anteriores, no existiendo grandes diferencias ni en el tipo ni en los porcentajes de FAME detectados. Únicamente se observó la aparición de un pequeño pico correspondiente al ácido 17:1 w8c. Empleando este mismo medio, al subir la temperatura de incubación de los aislados a 37° C nuevamente los picos principales fueron los mismos y en porcentajes similares, si bien pudo detectarse la aparición de tres nuevos picos en cantidades traza: 15:1 w8c, 15:0 3OH y SF1 (ácidos grasos 13:0 3OH y/o iso 15:1 H).

En Agar Sangre a 25° C fue donde se encontró que las cepas analizadas presentaban una mayor variedad en la composición de ácidos grasos, con un total de 18 picos, de los cuales 9 eran mayoritarios. Además de los siete picos principales ya mencionados que presenta *E. tarda* independientemente de las condiciones de cultivo, en agar sangre a 25° C aparecen también 2 picos principales más correspondientes a los ácidos grasos 18:1 w9c (ácido oleico) y 18:0 (ácido esteárico). En este mismo medio, al aumentar la temperatura de incubación a 37° C se reduce el número de picos totales, pasando de 18 a 15. Sin embargo, se aumenta el número de picos mayoritarios de 9 a 11, detectándose en proporciones mayores al 1% los ácidos grasos 17:0 (ácido margárico) y SF5 (18:2 w6,9c y/o 18:0 anteiso).

Tabla 3.10.- Composición de ácidos grasos de membrana en función del medio de cultivo y la temperatura. Los valores corresponden al porcentaje medio de cada ácido graso \pm la desviación estándar. Con el fondo en gris se resaltan los ácidos grasos con porcentaje mayor al 1%.

Ácidos grasos	TSA	TSA-1		AS	
	25° C	25°C	37°C	25°C	37° C
12:0	0.72 \pm 0.15	0.63 \pm 0.09	0.66 \pm 0.01	0.69 \pm 0.14	0.71 \pm 0.02
13:0	0.35 \pm 0.08	0.43 \pm 0.05	0.92 \pm 0.21	0.45 \pm 0.18	0.57 \pm 0.02
14:0	14.09 \pm 1.39	13.23 \pm 0.99	13.50 \pm 0.12	11.56 \pm 1.14	13.55 \pm 0.44
15:1 w8c	-	-	0.20 \pm 0.03	0.23 \pm 0.07	-
16:1 w5c	0.29 \pm 0.02	0.31 \pm 0.01	0.27 \pm 0.01	0.27 \pm 0.04	0.22 \pm 0.02
16:0	35.28 \pm 2.10	35.64 \pm 1.87	37.95 \pm 0.10	29.62 \pm 1.89	36.67 \pm 0.11
15:0 3OH	-	-	0.24 \pm 0.07	0.15 \pm 0.05	-
17:1 w8c	-	0.4 \pm 0.08	0.41 \pm 0.09	0.43 \pm 0.06	-
17:0 Δ	14.28 \pm 5.64	18.49 \pm 4.89	22.59 \pm 1.48	12.01 \pm 3.00	21.81 \pm 0.18
17:0	0.59 \pm 0.14	0.76 \pm 0.18	1.28 \pm 0.16	0.83 \pm 0.27	1.72 \pm 0.05
18:1 w9c	-	-	-	1.74 \pm 0.75	1.91 \pm 0.09
18:0	0.77 \pm 0.35	0.93 \pm 0.22	0.36 \pm 0.04	1.21 \pm 0.22	1.04 \pm 0.10
19:0 Δ w8c	1.28 \pm 0.31	1.15 \pm 0.48	1.88 \pm 0.16	1.02 \pm 0.17	3.98 \pm 0.09
SF1	-	-	0.70 \pm 0.18	0.44 \pm 0.15	0.51 \pm 0.04
SF2	9.19 \pm 0.88	8.59 \pm 1.12	8.44 \pm 0.31	8.88 \pm 1.10	8.60 \pm 0.11
SF3	16.85 \pm 5.07	13.39 \pm 4.97	7.79 \pm 1.63	22.54 \pm 2.84	4.96 \pm 0.39
SF5	-	-	-	0.94 \pm 0.12	1.65 \pm 0.08
SF8	5.98 \pm 0.76	6.05 \pm 0.59	2.82 \pm 0.47	7.08 \pm 1.20	2.27 \pm 0.30

c) Identificación de *E. tarda* empleando el sistema software Sherlock Microbial Identification System 4,5:

Todas las cepas de *E. tarda* incluidas en el estudio fueron correctamente identificadas mediante el software empleado independientemente del medio de cultivo y la temperatura de incubación. Así, en el 94% de las cepas analizadas el sistema de identificación mostró índices de similitud iguales o superiores a 0,600 y con una distancia con la segunda entrada mayor de 0,100, identificando todas ellas como *E. tarda*. Para el restante 6% de los aislados, el software aportó valores siempre superiores a 0,300 y con distancias mayores a 0,100 con la segunda posibilidad de identificación, por lo que en todos los casos puede considerarse una identificación correcta.

3.4.- DISCUSIÓN

Edwardsiella tarda es considerada en la actualidad uno de los patógenos emergentes en acuicultura marina (Toranzo, 2007). Desde su primera descripción en anguilas japonesas cultivadas (*Anguilla japonica*) (Wakabayashi & Egusa 1973), las infecciones producidas por este microorganismo han causado importantes pérdidas en diferentes especies de peces, entre las que podemos destacar: pez gato, anguila, platija, tilapia, (Meyer & Bullock, 1973; Kubota y col., 1981). En cuanto a los cultivos de rodaballo, solamente tenemos conocimiento de una única epizootia causada por este patógeno en Europa con anterioridad a este trabajo (Nougayrede y col., 1994). Sin embargo, el aislamiento repetitivo desde el año 2004 de cepas *E. tarda* procedentes de importantes epizootias ocurridas en plantas de cultivo de rodaballo situadas en diversos puntos de la geografía europea, indica que esta bacteria representa en la actualidad, un serio problema para el cultivo de esta especie (Castro y col., 2006).

A pesar de la importancia de esta bacteria para la acuicultura mundial, se han realizado pocos estudios sobre caracterización bioquímica, serológica y molecular comparando aislados de *E. tarda* procedentes de distintos hospedadores y orígenes geográficos. Estos datos son de gran importancia a la hora de realizar estudios desde el punto de vista epidemiológico así como para el desarrollo de programas de prevención efectivos frente a este patógeno.

La caracterización fenotípica de los distintos aislados incluidos en este estudio demostró una elevada homogeneidad desde el punto de vista bioquímico tanto entre los aislados de rodaballo, como también entre el resto de las cepas de *E. tarda* estudiadas con fines comparativos, independientemente del hospedador y del origen geográfico de las mismas. Esta homogeneidad a nivel fenotípico coincide con los datos aportados en estudios publicados anteriormente (Plumb, 1993).

Asimismo, se comprobó la utilidad del sistema miniaturizado API 20E para la correcta identificación de este patógeno, obteniendo en todos los casos porcentajes de identificación superiores al 99%, con lo que este sistema comercial resulta un método rápido y fiable para el diagnóstico de la enfermedad.

Los estudios serológicos basados en aislados de *E. tarda* son, hasta la fecha, escasos. Park y col. 1983, describieron la existencia de 4 serotipos (A, B, C y D) en aislados de anguilas y su entorno demostrando que el serotipo A se asociaría con las cepas más virulentas. Rashid y col. (1994), sugirieron también que sólo el serotipo A de *E. tarda* estaría asociado a la edwardsiellosis producida en cultivos de platija (*Paralichthys olivaceus*). Asimismo, Baya y col. (1997) demostraron que el aislado de lubina americana procedente de una epizootia ocurrida en la bahía de Chesapeake (USA) también pertenecía a este serotipo. Sin embargo, en todos estos estudios, el serotipo se estableció únicamente en base a ensayos de aglutinación o microaglutinación.

La caracterización serológica de las cepas de *E. tarda* realizada en el presente trabajo se basó en la preparación de dos antisueros distintos. Uno de ellos se obtuvo utilizando el primer aislado de rodaballo procedente de una planta del Sur de Europa (ACC35.1) y el otro antisuero se elaboró frente a la cepa 9.8 procedente de lubina americana y que fue empleada como cepa de referencia. Los resultados obtenidos mediante el ensayo de aglutinación en portaobjetos, permitieron demostrar que esta técnica es útil para la rápida detección del patógeno, independientemente del serotipo al que éste pertenezca, de su origen geográfico y de su hospedador; ya que todas las cepas estudiadas mostraron reacción de aglutinación con los dos antisueros empleados. Sin embargo, este ensayo no permitió establecer diferencias a nivel antigénico entre las cepas de *E. tarda*.

En base a los resultados obtenidos mediante las otras técnicas empleadas (microtitulación, Dot-Blot y Western Blot), se pudo establecer claramente la existencia de variabilidad serológica entre las cepas de *E. tarda*. Así, todos los aislados de rodaballo se incluyeron en un mismo grupo, homogéneo serológicamente, que era distinto al del resto de las cepas estudiadas. Esta homogeneidad serológica pudo comprobarse mediante el ensayo de inmunoblot de lipopolisacáridos (LPS) donde únicamente los LPS extraídos de las cepas aisladas de rodaballo reaccionaban frente al suero homólogo y, al mismo tiempo, ninguno de ellos reaccionaba frente al suero heterólogo de la cepa de referencia 9.8.

El hecho de que todos los aislados de rodaballo formen un grupo serológico único y diferente al del resto de cepas estudiadas resulta de gran utilidad a la hora de desarrollar vacunas y métodos de prevención más específicos y, por lo tanto, más eficaces contra la edwardsiellosis en rodaballo.

Cuando se analizaron los datos obtenidos a partir del análisis de ácidos grasos, resultó especialmente interesante el hecho de que, a pesar de la homogeneidad observada entre las cepas de *E. tarda* (independientemente de su origen) presentando todas ellas un total de 7 ácidos grasos principales, todos los aislados de rodaballo se agruparon en un único cluster, a cierta distancia del resto de cepas procedentes de otros hospedadores. En cuanto a los principales ácidos grasos detectados, los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con el estudio publicado por Panangala y col. (2006), en el que se empleaba esta técnica (entre otras) para establecer las diferencias interespecíficas entre *E. ictaluri* y *E. tarda*.

Aunque se sabe que determinados factores como pueden ser la composición del medio de cultivo o la temperatura de incubación influyen en la composición de ácidos grasos de diversas especies bacterianas (Salamah & Ali, 1995; Jøstensen & Landfald, 1996), no existe ningún estudio al respecto en *E. tarda*. Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral en cuanto al estudio de la influencia del medio de cultivo y la temperatura de incubación en el perfil de ácidos grasos de los aislados de *E. tarda* de rodaballo, parecen mostrar que la variedad de ácidos grasos detectados es mayor cuando las cepas crecen en un medio más rico como es el agar sangre. Por otra parte, para un mismo medio de cultivo el número de ácidos grasos principales también aumentaba a mayor temperatura de incubación. Sin embargo, esta variación en las condiciones de cultivo de las cepas no evitó en ningún caso la correcta identificación de los aislados mediante el Sistema de Identificación Sherlock Microbial Identification System 4,5.

En resumen, aunque la composición de ácidos grasos de *E. tarda* se ve influida por el medio de cultivo y la temperatura de incubación, el sistema MIDI permite la correcta identificación de los aislados en todos los casos independientemente de las variables de cultivo. Por lo tanto, proponemos el medio TSA-1 como un medio adecuado para el aislamiento y cultivo de cepas de *E. tarda* y su posterior análisis de composición de FAMES, en base a que se trata de un medio de uso general en laboratorios de diagnóstico en acuicultura y de menor coste que el agar sangre.

Characterization of *Edwardsiella tarda* strains isolated from turbot, *Psetta maxima* (L.)

N Castro, A E Toranzo, J L Barja, S Núñez and B Magariños

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Biología e Instituto de Acuicultura, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

Abstract

The biochemical, serological and molecular characteristics of a group of 21 *Edwardsiella tarda* strains isolated from turbot, *Psetta maxima*, in two different areas of Europe were analysed and compared with a total of 13 strains of this bacterial species with different geographical and host origins. All the turbot isolates were biochemically identical to the *E. tarda* strains included as reference. The use of different techniques including microagglutination, dot blot and Western blot of lipopolysaccharides allowed us to determine that all the turbot isolates constitute an homogeneous and distinctive serological group. Genetic analysis by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis demonstrated that although the *E. tarda* strains from turbot were compiled in a unique group using the primers P3 and P6, two clonal lineages could be detected when oligonucleotides P4 and P5 were employed.

Keywords: characterization, *Edwardsiella tarda*, genetic analysis, intraspecific diversity, serotypes, turbot.

Introduction

Edwardsiellosis, caused by the bacterium *Edwardsiella tarda*, is a serious systemic bacterial disease, which affects a variety of fish taxa and has a worldwide distribution in fresh and marine waters (Austin & Austin 1999). Moreover, *E. tarda* may

infect reptiles, amphibians, marine mammals and other warm-blooded animals (Plumb 1993). Fish infections with economically important losses have been reported in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum), eel, *Anguilla anguilla* (L.), tilapia, *Tilapia* spp., and flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel), in different geographical areas (Plumb 1993).

Although *E. tarda* causes generally diseases only in warm-water fish, this micro-organism also produces sporadic infections in salmonids (Amandi, Hiu, Rohovec & Fryer 1982) and in turbot, *Psetta maxima* (L.) (Nougayrede, Vuillaume, Vigneulle, Faivre, Luengo & Delprat 1994; Padrós, Zarza, Dopazo, Cuadrado & Crespo 2006). Numerous studies report that *E. tarda* constitutes a biochemically homogeneous taxon with typical characteristics of an enteric bacterium. However, in the majority of these descriptions, the serological properties of the strains have not been taken into account. Park, Wakabayashi & Watanabe (1983) and Rashid, Honda, Nakai & Muroga (1994) analysed the serological relationship among *E. tarda* strains isolated, respectively, from eel and flounder in Japan. They reported the existence of four different serotypes (A, B, C and D) with only the serotype A being highly virulent. However, to our knowledge, no studies on the antigenic properties of European strains of *E. tarda* have been performed.

Recently, repeated outbreaks of edwardsiellosis in turbot culture have occurred in different geographical areas of Europe and the disease has been economically significant for this important commercial fish species. Therefore, the objective of this study was to determine the antigenic characteristics and the possible intraspecific genetic diversity of a

Correspondence Dr B Magariños, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Biología e Instituto de Acuicultura, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain
(e-mail: mpbeam@usc.es)

group of European strains of *E. tarda* isolated from turbot in comparison with strains isolated from other fish species. These data are important not only from an epidemiological standpoint, but also to enable the development and formulation of an appropriate and effective vaccine(s) against turbot edwardsiellosis.

Materials and methods

Description of the disease and bacterial isolation

During recent years, epizootics of edwardsiellosis occurred in turbot cultured in northern and southern Europe. The first four outbreaks were in 2005 in both regions, and in 2006 three peaks of mortality at intervals of 1 month were recorded only in northern Europe (Table 1). In all cases, fish were stocked in concrete tanks with an open flow circuit and were fed with commercial dry pellets. The outbreaks affected different batches of fish ranging from 50 to 200 g.

Externally, the most consistent signs of the disease were small haemorrhages in the musculature, mainly in the head region, discolouration of the skin and tumefactions around the eyes. Internally, abundant ascitic fluid in the abdominal cavity and a haemorrhagic kidney was observed. In some cases, there were no apparent signs of disease.

For bacteriological analysis of diseased turbot, samples were taken from the eyes, kidney, spleen and muscle, and inoculated onto trypticase soya agar supplemented with 1% NaCl (TSA-1; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). Plates were incubated for 24 h at 25 °C.

Phenotypic characterization of the causative organism

Pure cultures of the isolates were subjected to taxonomical analysis by standard morphological, physiological and biochemical plate and tube tests (Herman & Bullock 1986; Baya, Romalde, Green, Navarro, Evans, May & Toranzo 1997). The commercial API 20E system (Biomérieux, Madrid, Spain) was used following the manufacturer's instructions, except that the temperature of incubation was set at 25 °C.

The drug sensitivities of the strains were determined by the disc diffusion method on Muller-Hinton agar (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) with 1% NaCl. The following chemotherapeutic agents ($\mu\text{g disc}^{-1}$) were used: flumequine (30), florfenicol (30), enrofloxacin (5), oxytetracycline (30), amoxicillin (10) and trimethoprim-sulphamethoxazole (25). Antibiogram readings were performed after 48 h incubation at 25 °C.

The type strain NCIMB 2034 as well as isolates of *E. tarda* from other fish species was included in all studies (Table 1). Stock cultures were maintained frozen at -80 °C in Criobille tubes (AES Laboratory, Lyon, France).

Serological characterization

Serological assays were carried out using whole cell preparations as well as heat stable O antigens of each strain of *E. tarda*. Somatic O antigens were obtained following the protocols of Magariños, Romalde, Bandín, Fouz & Toranzo (1992).

Antisera against the turbot strain ACC 35.1 (recovered in the epizootic occurring in southern

Source	Year of Isolation	Origin
Turbot (<i>Psetta maxima</i>) (3) ^a	2005 (1) ^b	Southern Europe
Turbot (<i>P. maxima</i>) (7)	2005 (3)	Northern Europe
Turbot (<i>P. maxima</i>) (11)	2006 (3)	Northern Europe
Catfish (<i>Ictalurus punctatus</i>) (1)	1979	USA
Tilapia (<i>Tilapia nilotica</i>) (2)	1979	Japan
Eel (<i>Anguilla japonica</i>) (2)	1981	Japan
Striped bass (<i>Morone saxatilis</i>) (1)	1986	USA
Striped bass (<i>M. saxatilis</i>) (1)	1994	USA
Flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>) (2)	2002	Japan
Red sea bream (<i>Pagellus bogaraveo</i>) (3)	2002	Japan
Pacific Salmon (1)	1999	Chile
NCIMB 2034 (unknown species)	1965	NCIMB ^c

Table 1 Origin of isolates of *Edwardsiella tarda* from fish used in this study

^a Number of strains.

^b Number of outbreaks. The turbot strain used to raise the antiserum was recovered from the outbreaks occurring in 2005 in southern Europe.

^c National Collection of Industrial Bacteria.

Europe in 2005) and one isolate from striped bass (strain 9.8) were prepared by i.v. injection of rabbits with formalin-killed cells suspended in saline solution as previously described (Magariños *et al.* 1992). In addition, in some assays, absorbed antisera with the heterologous antigen were used following the procedures of Romalde, Magariños, Barja & Toranzo (1993).

Slide agglutination tests using the O-antigen suspensions were conducted following the procedures of Toranzo, Baya, Roberson, Barja, Grimes & Hetrick (1987). A strong and rapid agglutination was recorded as a positive result.

Quantitative agglutination tests were carried out by a microtitre plate system using safranin O dye to make the reaction readily visible (Stevenson & Daly 1982). The agglutination titre was considered as the reciprocal of the highest dilution of the antiserum giving a positive reaction after overnight incubation with the antigen at 15 °C.

Dot-blot analysis was also performed using the O antigens and unabsorbed and absorbed antisera against *E. tarda* strains, as described by Cipriano, Pyle, Starliper & Pyle (1985). Only a reaction similar to that exhibited by the homologous strain was scored as positive.

Extraction of lipopolysaccharides (LPS) and electrophoretic analysis

The extraction of the LPS present in the cell wall of the isolates was performed using the method of Hitchcock & Brown (1983). Samples (15 µL) were subjected to sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (Laemmli 1970), with 12% (w/v) acrylamide in the resolving gel and 4% (w/v) acrylamide in the stacking gel, using a Mini ProteanR Cell apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Immunoblotting analysis of LPS was performed according to the procedures of Towbin, Staehelin & Gordon (1979), in a semi-dry transblot apparatus (Mini Trans-Blot R Electrophoretic Cell; Bio-Rad). After transfer, immobilized LPS were detected using the unabsorbed and absorbed antisera.

Randomly amplified polymorphic DNA analysis

DNA isolation and amplification reactions were performed using the Insta-Gene matrix (Bio-Rad) and the Ready-To-Go randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis beads (Pharmacia Biotech, Barcelona, Spain), respectively, as previ-

ously described (Magariños, Toranzo, Barja & Romalde 2000). Amplifications were carried out in a T Gradient Thermocycler (Biometra Goethingen, Germany), and the RAPD products were electrophoresed in a 1.5% agarose gel and stained with ethidium-bromide (Bio-Rad). A 50–2000-bp ladder (Sigma, St. Louis, MI, USA) was used as a molecular mass marker. The reproducibility of the results was determined by repetition in at least three independent RAPD assays.

All the gels were scanned and the images captured by a Gel-Doc-2000 Gel Documentation System (Bio-Rad). The data analysis was performed by using the Diversity database software (Bio-Rad) and the computed similarities among the isolates were estimated by means of the Dice coefficient (Dice 1945).

Results

Biochemical characterization

The 34 *E. tarda* strains used were biochemically homogeneous regardless of the source of isolation, except for their capacity to grow using the citrate as the sole carbon source in Simmon's citrate medium. All the bacterial isolates from turbot and the collection strains were Gram-negative, motile rods, catalase positive and unable to produce cytochrome oxidase. The biochemical tests showed that they were fermentative, and positive for indol, nitrate reduction, production of gas glucose and lysine and ornithine decarboxylase. These characteristics allowed their presumptive identification as *E. tarda*. In addition, the miniaturized system API 20E confirmed the assignation of the strains as *E. tarda*. All the strains exhibited the same profile 4 744 000.

The *E. tarda* strains showed the same susceptibility pattern to all the chemotherapeutic agents evaluated and were thus susceptible to all the antibacterial compounds tested.

Serological analysis

Slide agglutination assays using whole cells and O-antigens revealed cross-reactions for all strains regardless of host origin and serum used. However, the results of microtitre agglutination, dot-blot assays and Western-blot, showed different patterns of serological reactivity among the strains (Table 2). Thus, with the microtitre agglutination tests, two serological groups were observed. Group 1 comprised all the isolates from turbot, which reacted

Table 2 Results of microtitre agglutination test, dot blot assay and Western blot analysis with O-antigens and unabsorbed and absorbed rabbit antisera raised against representative *Edwardsiella tarda* strains. ++ strong and immediate reaction; + delayed positive reaction; – negative reaction. A reaction was considered positive if it was similar to the reaction exhibited by the homologous strain. Antigens used to absorb the serum are shown in parentheses

Strains from	Microtitre agglutination with serum anti-		Dot blot assay with serum anti-			Western lipopolysaccharides analysis with serum	
	9.8	ACC 35.1	9.8	ACC 35.1	9.8 (ACC 35.1)	9.8	ACC 35.1
Turbot (21)	40–80	160–640	(+)	++	–	–	++
Striped bass (2)	320–640	<10	++	–	++	++	–
Flounder (2)	640	<10	(+)	–	–	–	–
Red sea bream (3)	640	<10	(+)	–	–	–	–
Catfish (1)	80	<10	(+)	–	–	–	–
Tilapia (2)	160	<10	++	–	+	–	–
Japanese eel (2)	160	<10	++	–	+	–	–
NCIMB 2034 (1)	80	<10	(+)	–	–	–	–
Pacific salmon (1)	80	<10	(+)	–	–	–	–

strongly with the serum raised against the ACC35.1 strain (titres from 320 to 640) and showed a weak reaction with the serum from the 9.8 strain (titre 80), and group 2 comprised the *E. tarda* isolates from the other fish species, which reacted with the 9.8 antiserum (titres from 80 to 640), but not with the serum against the turbot strain.

With the dot blot assays, the *E. tarda* strains from turbot showed a strong reaction with the homologous antiserum (Fig. 1a), and also a weak cross-reaction with the serum against the striped bass isolate (Fig. 1b). This cross-reaction disappeared when this serum was absorbed with a heterologous turbot strain (Fig. 1c). The isolates from the other fish species reacted only with the unabsorbed serum from the 9.8 strain. When this absorbed serum was used, the positive results obtained for the isolates from catfish, Pacific salmon and the NCIMB 2034 collection strain also disappeared.

Immunoblot analysis of the LPS clearly revealed that all the turbot isolates, regardless their geographical origin, constituted an homogeneous 'O' serogroup, with all the strains showing a strong immunological reaction only with the serum raised against the turbot isolate (Fig. 2a). With this methodology, no cross-reaction was observed among these strains and with the serum raised against striped bass strain 9.8 (Fig. 2b). Therefore, assays with the absorbed sera were unnecessary.

In the isolates from the other fish species, only the LPS from the 9.8 strain reacted strongly with the homologous serum. For the other isolates, no immunological reaction was observed with any sera.

RAPD analysis

Initially, an RAPD analysis of one strain of *E. tarda* from turbot (ACC 35.1) was performed using each

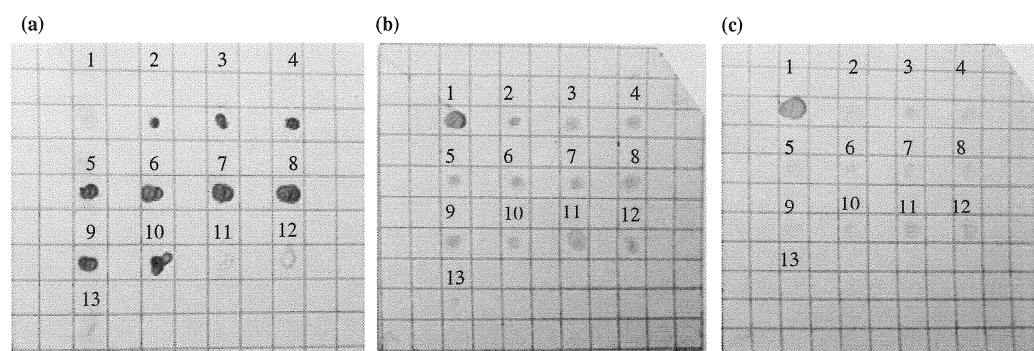


Figure 1 Dot Blot assay using the antiserum raised against the turbot isolate ACC35.1 (a), the unabsorbed serum 9.8 (b) and the absorbed serum 9.8 (c). Dots: 1, 9.8; 2 to 10, turbot isolates; 11, NCIMB 2034 strain; 12, eel isolate; 13, PBS.

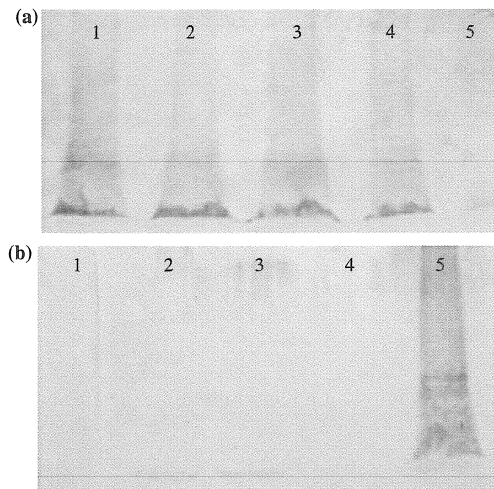


Figure 2 Western blot analysis of lipopolysaccharides of *Edwardsiella tarda* strains using the antisera raised against (a) turbot strain ACC 35.1 and (b) striped bass isolate 9.8. Lanes: 1–4, turbot isolates and 5, striped bass isolate 9.8.

of the six primers provided in the commercial kit. Oligonucleotides P3, P4, P5 and P6 generated reproducible patterns with an appropriate number of amplified products suitable for an accurate analysis. These primers were then used to analyse the complete collection of strains.

As shown in Fig. 3, the patterns obtained with primer P6 allowed us to compile the majority of *E. tarda* strains into a unique group showing a similarity level of almost 100%. Only the reference strain NCIMB 2034 and the isolate from catfish showed a different profile. Similar results were obtained with primer 3 (data not shown). However, when the primers P4 and P5 were used, the isolates were separated into different groups depending on

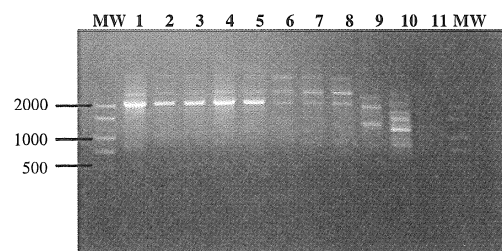


Figure 3 Randomly amplified polymorphic DNA fingerprints obtained for the *Edwardsiella tarda* isolates using primer 6. Lanes: MW, Amplisize Molecular Ruler (50–2000 pb ladder; Sigma); 1–8 turbot isolates; 9, catfish isolate; 10, NCIMB 2034; 11, negative control.

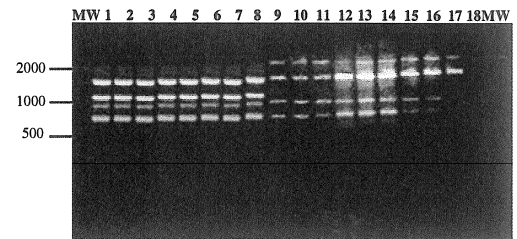


Figure 4 Randomly amplified polymorphic DNA fingerprints obtained for *Edwardsiella tarda* strains isolated from turbot using primer 4. Lanes: MW, Amplisize Molecular Ruler (50–2000 pb ladder; Sigma); 1 and 2, turbot isolates from southern Europe; 3–8, turbot isolates obtained from outbreaks in 2005; 9–17, turbot isolates obtained in 2006; 18, negative control.

the source of isolation. Thus, all the strains from turbot were compiled in a unique group with a different fingerprint from those obtained for the other *E. tarda* isolates. Moreover, with these oligonucleotides, we could also establish two subgroups within the turbot strains. One subgroup (A) comprised all the isolates from southern Europe (3) and the northern European isolates obtained from the first outbreaks (5 strains) and the other subgroup (B) included the remaining strains from northern Europe (2 isolates from 2005 and 11 from 2006). The similarity between both subgroups, estimated on the basis of the Dice coefficient, was of 80%. Figure 4 presents the RAPD patterns obtained for the turbot isolates.

Discussion

Edwardsiella tarda can be considered as a re-emerging pathogen in marine aquaculture. As its first description in cultured Japanese eel (Wakabayashi & Egusa 1973), infections by this micro-organism have caused important mortalities among different fish species, including eels, flounder, tilapia and more recently turbot. However, few comparative characterization studies among isolates with diverse host and geographical origins have been carried out. Such data can be important for epidemiological studies as well as for implementing effective preventive measures against this pathogen.

Serological studies on *E. tarda* isolated from cultured fish are scarce. Park *et al.* (1983) reported the existence of 4 serotypes (A, B, C and D) of *E. tarda* isolated from eels and their environment. Moreover, they demonstrated that the type A comprises the most virulent strains, as assessed

from experimental infections in eels and other fish. Rashid *et al.* (1994) suggested that only serotype A of *E. tarda* was associated with edwardsiellosis in cultured Japanese flounder. In addition, Baya *et al.* (1997) demonstrated that the *E. tarda* strain isolated from an epizootic in wild striped bass in the Chesapeake Bay (USA) also belongs to this serotype. However, in all these studies, the serotyping was based only on agglutination or microagglutination assays.

Nucci, da Silveira, da Silva Corrêa, Nakazato, Bando, Ribeiro & Pestana de Castro (2002) used a RAPD test to analyse *E. tarda* strains isolated in different countries from fish and humans. They showed that, with a few exceptions, this methodology allowed the separation of strains into two clusters related to the source of isolation.

In the present study, a group of European strains of this pathogen isolated from recent epizootics in cultured turbot was analysed biochemically, serologically and genetically, in order to determine the possible variability existing among them.

The phenotypic characterization of the isolates showed biochemical homogeneity among the *E. tarda* strains isolated from turbot and all the other collection strains, regardless of the source of isolation.

The results of serological analysis demonstrate that, although the slide agglutination technique is useful for the rapid identification of all the *E. tarda* strains, it does not allow the distinction of serotypes. However, the microtitration and dot blot experiments clearly demonstrated the existence of serological variability within *E. tarda* with all the isolates from turbot included into a distinctive homogeneous serological group. This serological homogeneity was confirmed by the immunoblot analysis of LPS.

Despite the high phenotypic and serological homogeneity observed among the *E. tarda* isolates from turbot, the RAPD procedure detected heterogeneity within this group of strains. Thus, although the RAPD analysis with the oligonucleotides P3 and P6 distributed the turbot isolates in a unique group, with the primers P4 and P5 the existence of two different clonal lineages co-existing in a single farm could be detected.

Acknowledgements

This work was supported in part by Grant No. AGL2004-07037 from the Ministerio de Educa-

ción y Ciencia (Spain). N. Castro thanks the Xunta de Galicia (Spain) for a fellowship.

References

- Amadi A., Hiu S.F., Rohovec J.S. & Fryer J.L. (1982) Isolation and characterization of *Edwardsiella tarda* from fall Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Applied and Environmental Microbiology* **43**, 1380–1384.
- Austin B. & Austin D.A. (1999) Characteristics of the diseases. In: *Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish*, 3rd edn (ed. by B. Austin & D.A. Austin), pp. 13–15. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Baya A.M., Romalde J.L., Green D.E., Navarro R.B., Evans J., May E.B. & Toranzo A.E. (1997) Edwardsiellosis in wild striped bass from the Chesapeake Bay. *Journal of Wildlife Diseases* **33**, 517–525.
- Cipriano R.C., Pyle J.B., Starliper C.E. & Pyle S.W. (1985) Detection of *Vibrio anguillarum* antigen by dot blot assay. *Journal of Wildlife Diseases* **21**, 211–218.
- Dice L.R. (1945) Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology* **26**, 297.
- Herman R.L. & Bullock G.L. (1986) Pathology caused by the bacterium *Edwardsiella tarda* in striped bass. *Transactions of the American Fisheries Society* **115**, 232–235.
- Hitchcock P.J. & Brown T.M. (1983) Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *Journal of Bacteriology* **154**, 269–277.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Magariños B., Romalde J.L., Bandín I., Fouz B. & Toranzo A.E. (1992) Phenotypic, antigenic and molecular characterization of *Pasteurella piscicida* strains isolated from fish. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 3316–3322.
- Magariños B., Toranzo A.E., Barja J.L. & Romalde J.L. (2000) Existence of two geographically-linked clonal lineages in the bacterial fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* evidenced by random amplified polymorphic DNA analysis. *Epidemiology and Infection* **125**, 213–219.
- Nougayrede P.H., Vuillaume A., Vigneulle M., Faivre B., Luengo S. & Delprat J. (1994) First isolation of *Edwardsiella tarda* from diseased turbot (*Scophthalmus maximus*) reared in a sea farm in the Bay of Biscay. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **14**, 128–129.
- Nucci C., da Silveira W.D., da Silva Corrêa S., Nakazato G., Bando S.Y., Ribeiro M.A. & Pestana de Castro A.F. (2002) Microbiological comparative study of isolates of *Edwardsiella tarda* isolated in different countries from fish and humans. *Veterinary Microbiology* **89**, 29–39.
- 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.
- Park S., Wakabayashi H. & Watanabe Y. (1983) Serotype and virulence of *Edwardsiella tarda* isolated from eel and their environment. *Fish Pathology* **18**, 85–89.

- Plumb J.A. (1993) *Edwardsiella septicaemia*. In: *Bacterial Diseases of Fish* (ed. by V. Inglis, R.J. Roberts & N.R. Bromage), pp. 61–79. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Rashid M.M., Honda K., Nakai T. & Muroga K. (1994) An ecological study of *Edwardsiella tarda* in flounder farms. *Fish Pathology* **29**, 221–227.
- Romalde J.L., Magariños B., Barja J.L. & Toranzo A.E. (1993) Antigenic and molecular characterization of *Yersinia ruckeri*. Proposal for a new intraspecies classification. *Systematic and Applied Microbiology* **16**, 411–419.
- Stevenson R.M.W. & Daly J.G. (1982) Biochemical and serological characteristics of Ontario isolates of *Yersinia ruckeri*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **39**, 870–876.
- Toranzo A.E., Baya A., Roberson B.S., Barja J.L., Grimes D.J. & Hetrick F.M. (1987) Specificity of slide agglutination test for detecting bacterial fish pathogens. *Aquaculture* **61**, 81–97.
- Towbin H., Staehelin T. & Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceeding of the National Academy of Science* **76**, 4350–4354.
- Wakabayashi H. & Egusa S. (1973) *Edwardsiella tarda* (*Paracolobactrum anguillimortiferum*) associated with pond-cultured eel diseases. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **39**, 931–939.

Received: 9 May 2006

Revision received: 15 June 2006

Accepted: 3 July 2006

Sección 4

Caracterización molecular de E. tarda

4.1.- INTRODUCCIÓN

4.1.1.- Análisis proteico de *Edwardsiella tarda*:

Hasta la fecha, son pocos los trabajos que se han dedicado al estudio de la composición proteica de *E. tarda*. Aoki & Holland (1985) describieron la existencia de dos proteínas externas de pared ("outer" o OMP) mayoritarias de 36 y 46 kDa. A su vez, Tu & Kawai (1998) aislaron tres OMP de 37, 40 y 43 kDa a partir de una cepa de anguila japonesa. También Darwish y col. publicaban un estudio en el 2001 donde analizaban el efecto de la temperatura y la salinidad en la composición de OMP de *E. tarda*. Los resultados que obtuvieron mostraron que ambos parámetros podían influir en el perfil proteico y que las cepas incubadas a 25^o C presentaban unas OMP mayoritarias de 40, 36.5, 34, 28.5 y 25 kDa y un amplio número de proteínas minoritarias entre 10 y 120 kDa. Además, observaron que existía bastante heterogeneidad entre las distintas cepas estudiadas.

En el año 2002 Tan y col., realizaron un análisis proteómico comparativo entre cepas virulentas y avirulentas de *E. tarda*, encontrando la existencia de proteínas extracelulares específicas del grupo de las cepas virulentas e identificando dos de ellas como flagelina y SseB (secretion system effector protein), conocidos factores de virulencia en patógenos bacterianos.

Maiti y col. (2009) también emplearon la técnica de SDS-PAGE con proteínas totales de envoltura para realizar un estudio comparativo entre cepas de *E. tarda* aisladas de sedimentos de tanques de cultivo. Encontraron una gran heterogeneidad en las cepas estudiadas, con perfiles compuestos de 20-23 bandas de pesos moleculares entre 14 y 110 KDa, aunque todos los perfiles compartían ocho bandas comunes comprendidas entre 38 y 83 KDa.

4.1.2.- Contenido plasmídico de *Edwardsiella tarda*:

También son escasos los trabajos dedicados al estudio de la presencia de plásmidos en *E. tarda*. Se ha encontrado la presencia de plásmidos que varían entre 3 y 185 kb (2 y 120 MDa) en algunas cepas de *E. tarda*, si bien su presencia no ha podido ser asociada a la virulencia de las mismas. La presencia de plásmidos R en *E. tarda* que codificaban para la resistencia a antibióticos fue

descrita por Aoki y col. en 1977. Posteriormente, Toranzo y col. (1983) describieron la presencia de un plásmido en cepas de *E. tarda* de aproximadamente 120 Kb (78 MDa). Aoki & Tabahashi (1987) descubrieron la existencia de un plásmido de clase D en aislados de *E. tarda* que codificaba para la resistencia a tetraciclina y que se encontraba también en otros patógenos bacterianos marinos y de agua dulce. Más recientemente, Reger y col. (1993) y Maiti y col. (2009) encontraron diferentes tipos de plásmidos entre 5 y 76 Kb y 9 y 23 Kb respectivamente.

4.1.3.- Aplicación de técnicas moleculares para la caracterización de *Edwardsiella tarda*:

Hasta la actualidad, no existen demasiados estudios encaminados a la caracterización de cepas de *E. tarda* empleando métodos moleculares. Entre los pocos trabajos disponibles, podemos destacar el realizado por Nucci y col. (2002) en el que emplearon la técnica de amplificación aleatoria del DNA (RAPD) para analizar cepas aisladas de peces y humanos en diversas localizaciones geográficas. En base a los perfiles obtenidos pudieron establecer dos grupos diferenciados, el primero formado mayoritariamente por las cepas procedentes de peces y el segundo formado por los aislados de humanos.

Por otra parte, en el año 2008 Maiti y col. compararon las técnicas de BOX-PCR y PCR-ribotipado con el fin de determinar cuál era más discriminativa. Las cepas empleadas fueron aislados de *E. tarda* procedentes de agua dulce y peces aparentemente sanos y los resultados obtenidos indicaron que la técnica más discriminativa era la BOX-PCR.

Más recientemente, Maiti y col. (2009) realizaron una caracterización de diferentes cepas de *E. tarda* empleando, entre otras, la técnica de ERIC-PCR. Los resultados mostraron que esta técnica molecular resultaba útil para establecer diferencias intraespecíficas dentro de los aislados y, por tanto, podría resultar de utilidad en la realización de futuros estudios epidemiológicos.

En este capítulo se llevó a cabo una caracterización de un grupo de cepas de *E. tarda* mediante técnicas de análisis de proteínas, contenido plasmídico y tipado molecular con el fin de determinar la posible variabilidad intraespecífica de la especie.

4.2.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1.- Cepas bacterianas empleadas:

En este apartado se empleó la colección de cepas que se muestra en la Tabla 4.1. En la misma se incluyeron un total de 38 aislados de rodaballo, representativos de cinco plantas de cultivo y procedentes de diferentes años de aislamiento, así como un total de 12 cepas de *E. tarda* procedentes de otros orígenes.

4.2.2.- Análisis proteico: SDS-PAGE

Para el análisis de proteínas de la envoltura celular se siguieron los procedimientos descritos por Crosa & Hodges (1981). Se partió de cultivos celulares en medio líquido (TSC-1) que fueron centrifugados a 10000 rpm durante 10 min a 4°C. El pellet resultante se resuspendió en 3 ml de una solución de Tris-HCl (10 mM, pH 8.0) y se sonicaron las células en un sonicador Branson 250 (60 W, 30 s). A continuación se realizó una centrifugación a 17000 rpm durante 60 min a 4°C. La fracción correspondiente a las proteínas de membrana externa se obtuvo mediante el método de Filip y col. (1973), mediante la adición de lauryl sarcosinato de sodio (3%) (Sigma) en Tris HCl 20 mM (pH 8) y dejando las muestras a temperatura ambiente durante 20 min. A continuación, se recogieron las proteínas mediante centrifugación a 17000 rpm durante 60 min a 4°C. Tanto las proteínas totales como las “outer” se mantuvieron a -30°C hasta su uso posterior. Los productos de la extracción de proteínas fueron visualizados mediante SDS-PAGE, empleando la técnica descrita por Laemmli (1970) (ver Sección 3, apartado 3.2.4 f).

Tabla 4.1.- Cepas de *E. tarda* empleadas en esta sección. ND: sin dato.

CEPA	AÑO	HOSPEDADOR	ORIGEN
ACC35.1	2005	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Sur de Europa
ACC36.1	2005	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Sur de Europa
ACC51.1	2006	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Sur de Europa
ACC52.1	2006	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Sur de Europa
ACC53.1	2006	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Sur de Europa
ACC69.1	2006	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Sur de Europa
ACC70.1	2006	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Sur de Europa
ACC121.1	2009	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Sur de Europa
HL1.1	2004	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Norte de Europa
HL8.1	2005	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Norte de Europa
HL9.1	2005	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Norte de Europa
HL10.1	2005	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Norte de Europa
HL12.1	2005	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Norte de Europa
HL14.1	2005	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Norte de Europa
HL21.2	2006	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Norte de Europa
HL21.3	2006	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Norte de Europa
HL23.1	2006	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Norte de Europa
HL24.1	2006	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Norte de Europa
HL25.1	2006	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Norte de Europa
HL30.1	2006	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Norte de Europa
HL31.1	2006	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Norte de Europa
HL37.1	2006	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Norte de Europa
HL38.1	2006	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Norte de Europa
HL42.1	2006	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Norte de Europa
HL43.1	2006	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Norte de Europa
RM288.1	2006	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Sur de Europa
RM289.1	2006	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Sur de Europa
RM290.1	2006	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Sur de Europa
RM293.1	2006	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Sur de Europa
RM294.1	2006	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Sur de Europa
RBR7.1	2008	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Sur de Europa
RBR8.1	2008	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Sur de Europa
RBR13.1	2008	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Sur de Europa
ACR326.1	2009	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Sur de Europa
ACR327.1	2009	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Sur de Europa
ACR328.1	2009	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Sur de Europa
ACR1.1-10	2010	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Sur de Europa
ACR2.1-10	2010	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Sur de Europa
E.11-2	ND	Anguila japonesa (<i>Anguilla japonica</i>)	Japón
EDK1	ND	Anguila japonesa (<i>Anguilla japonica</i>)	Japón
9.8	1986	Lubina americana (<i>Morone saxatilis</i>)	U.S.A.
FL4-534K	1997	Lubina americana (<i>Morone saxatilis</i>)	U.S.A.
WFE1	2002	Platija (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	Japón
WFE10	2002	Platija (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	Japón
ET001	2002	Besugo (<i>Pagellus bogaraveo</i>)	Japón
ET009	2002	Besugo (<i>Pagellus bogaraveo</i>)	Japón
KGE7901	ND	Tilapia (<i>Tilapia nilotica</i>)	Japón
81.48	ND	Pez gato (<i>Ictalurus punctatus</i>)	U.S.A.
FL3-22	ND	Pez angel	U.S.A.
NCIMB2034	1977	Pez (especie sin determinar)	NCIMB

4.2.3.- Análisis proteómico: MALDI-TOF

El término MALDI-TOF-MS corresponde a las siglas Matrix-Assited Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry. Esta técnica está considerada como una herramienta eficaz para el análisis de microorganismos (Stîngu y col., 2008) y utiliza como método de ionización la desorción láser asistida por matriz y un analizador de tiempo de vuelo. Las medidas de las muestras se realizaron en la Unidade de Masas e Proteómica perteneciente a la RIAIDT (Rede de Infraestruturas de Apoio á Investigación e ao Desenvolvemento Tecnolóxico) de la Universidad de Santiago de Compostela.

En el análisis mediante MALDI-TOF-MS, péptidos y proteínas son separados acorde a su relación masa/carga (m/z) dando lugar a un patrón de picos característicos que se convierte en una huella molecular única para cada microorganismo, y que puede ser empleada tanto para la caracterización de los mismos como para su identificación mediante la comparación con perfiles conocidos de organismos depositados en bases de datos.

La preparación de las muestras se realizó a partir de cultivos puros en placa incubados durante 24 h. Se resuspendió un asa de siembra calibrada del cultivo celular en 300 μ l de agua destilada estéril y posteriormente se le añadieron 900 μ l de etanol absoluto. Tras mezclar la suspensión, las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 2 min y se desechó el sobrenadante. A continuación, se añadieron 50 μ l de ácido fórmico (70%) y se mezcló con el precipitado pipeteando varias veces. Una vez mezclado se adicionaron 50 μ l de acetonitrilo y la mezcla se centrifugó a máxima velocidad durante 2 min. Un μ l del sobrenadante de este producto final se depositó en el centro de una de las posiciones (spots) marcadas en la placa de acero (MTP 384 target plate ground steel T F) de 384 posiciones y se dejó secar al aire. A continuación, se cubrió cada spot con 1 μ l de matriz (solución saturada de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico en 50 % de acetonitrilo y 2.5% de ácido trifluoroacético). Así, la muestra se mezcla con la matriz sobre una superficie de metal de tal forma que ambas cocrystalizan cuando se evapora el solvente.

Estas preparaciones se analizaron en un espectrómetro de masas MALDI-TOF Autoflex (Bruker Daltonik GmbH, Leipzig, Alemania). Después de hacer una calibración manual de la región m/z con un Standard conocido, se obtuvo el espectro entre 2-20 KDa de forma automática, y se

trabajó en modo lineal positivo a una frecuencia de 50 Hz. Los parámetros que se fijaron para el espectrómetro fueron IS1 a 20 kV, IS2 a 18.6 kV, lente a 7.5 kV y PIE a 250 ns, variando algunos de los mismos adecuadamente según el resultado del calibrante en el momento de inicio de la medida del mismo, para obtener espectros con una buena relación de intensidad y resolución.

Los distintos espectros obtenidos son comparados entre sí de forma manual para seleccionar los 20 mejores, bajo criterios de búsqueda de mayor resolución, exactitud de masa e intensidad en todo el rango m/z . La nueva cepa se introduce entonces en la base de datos que va creando el software. El protocolo de trabajo del MALDI-TOF proporciona la adquisición óptima de la muestra, es decir, una acumulación de 600 disparos del láser en pasos de 100 disparos en diferentes lugares de la muestra y variando la zona de disparo en cada uno de los spots preparados de esa misma cepa, según se hacen repeticiones.

Para la medición de espectros se empleó el Software FlexControl mientras que la comparación y análisis de perfiles de espectros se realizó con el software FlexAnalysis 3.0. Para la creación de bases de datos e identificación de los aislados se usó el software Biotyper 1.1, todos ellos de Bruker Daltonic GmbH (Alemania). Este último software lleva integrados diferentes algoritmos que permiten la identificación de espectros y la creación de dendrogramas. Para la identificación, el resultado del análisis se expresa como un listado de posibles identificaciones con una fiabilidad estadística de identificación para cada una de ellas. El significado de los valores de identificación obtenidos se muestra en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2.- Significado de los valores de identificación del sistema de identificación MALDI-TOF.

VALOR	SIGNIFICADO
2,300-3,000	Identificación a nivel de especie
2,000-2,299	Identificación a nivel de género, posible identificación a nivel de especie
1,700-1,999	Posible identificación a nivel de género
0,000-1,699	No identificación

4.2.4.- Análisis del contenido plasmídico:

Para la extracción y purificación del DNA plasmídico a pequeña escala se empleó el kit comercial Qiaprep Spin Miniprep (Qiagen, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los productos obtenidos se visualizaron empleando geles horizontales de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio (Bio-Rad) a 100 v durante 100 min utilizándose un marcador GeneRuler™ de 1 kb (Fermentas, España) como indicador de la masa molecular.

Para poder determinar la similitud de los plásmidos con la misma masa molecular detectados en las cepas de rodaballo de *E. tarda*, se llevó a cabo un mapa de restricción de cada uno de los plásmidos detectados en estos aislados. Para ello, se recortaron las bandas correspondientes del gel de agarosa y se purificaron los productos empleando el kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (QiaGen, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este producto se sometió a la reacción de digestión añadiendo aproximadamente 1 µg de DNA y una unidad de enzima en un volumen final de 20 µl, que se incubaron a 37° C durante 4 horas o 5 min según la enzima empleada. Se probaron varias enzimas con el fin de determinar cuál era la más indicada para la digestión: HindIII, XbaI, BamHI, RsaI y DraI (New England Biolabs, UK) y Fast Digest EcoRI (Fermentas, España).

4.2.5.- Extracción del DNA:

El ADN cromosómico de las cepas de *Edwardsiella tarda* fue extraído usando la matriz InstaGene Matrix (Bio-Rad, Madrid) siguiendo el procedimiento descrito por Romalde y col. (1999). Las colonias de los aislados de *E. tarda* se recogieron de cultivos frescos en placa y se resuspendieron en 1 ml de agua esterilizada para, a continuación, centrifugarlas durante 1 minuto a 12000 rpm. Tras eliminar los sobrenadantes, los precipitados se resuspendieron en 200 µl de InstaGene Matrix, y se incubaron a 56°C durante 30 minutos. A continuación se mezclaron a alta velocidad durante 10 segundos y se hirvieron en agua durante 8 minutos. Se mezclaron nuevamente a alta velocidad, y se centrifugaron a 12000 rpm durante 3 minutos.

La concentración de cada muestra de ADN se examinó en el espectrofotómetro a 260 nm y se ajustó la concentración a 10-20 ng/μl. Las muestras de ADN se mantuvieron a -20°C hasta su uso para las reacciones de PCR.

4.2.6.- Técnicas de genotipado:

Todas las reacciones de PCR realizadas para cada una de las técnicas de tipado molecular se realizaron simultáneamente en un termociclador T-Gradient Thermocycler (Biometra, Alemania) y en un Mastercycler personal (Eppendorf, Alemania).

a) RAPD:

Las amplificaciones aleatorias de los polimorfismos de ADN o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) se llevaron a cabo usando Ready-To-Go RAPD Beads (Amersham Pharmacia Biotech, USA). Este producto comercial ha sido optimizado para las reacciones de PCR y contiene buffer, nucleótidos y Taq-ADN polimerasa. Los únicos productos que es necesario añadir a la reacción son el ADN extraído, los cebadores, también proporcionados en el kit comercial, y agua destilada triestéril. Dicho kit proporciona seis cebadores que fueron incluidos en este estudio:

P1: 5'-d[GGTGCGGGAA]-3'

P4 5'-d[AAGAGCCCGT]-3'

P2: 5'-d[GTTTCGCTCC]-3'

P5 5'-d[AACGCGCAAC]-3'

P3: 5'-d[GTAGACCCGT]-3'

P6 5'-d[CCCGTCAGCA] -3'

Cada reacción de RAPD incluyó 1 μl de ADN purificado bacteriano, 5 μl del cebador empleado (25 pmol), 19 μl de agua destilada triestéril y una Ready-To-Go RAPD Bead (1,5 unidades de Taq polimerasa, 10 mM Tris HCL (pH 9,0), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂ y 200 μM de cada dNTP). El protocolo de amplificación aleatoria de ADN se muestra en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3.- Protocolo de amplificación de ADN para la técnica RAPD.

FASE	TEMPERATURA (°C)	DURACIÓN (min)	
Desnaturalización inicial	95	5	
Desnaturalización	95	1	30 ciclos
Hibridación	35	1	
Elongación	72	2	
Elongación final	72	5	

b) ERIC-PCR:

La técnica de ERIC-PCR (Stern y col., 1984; Hulton y col., 1991) es una técnica de tipificación utilizada para estudiar la relación clonal en diversas bacterias gramnegativas y se basa en la amplificación de secuencias ERIC (secuencias palindrómicas intergénicas de enterobacterias) que se encuentran a lo largo del genoma bacteriano. Los cebadores específicos empleados fueron (Versalovic y col., 1991):

ERIC1R: 5'-ATGTAAGCTCCTGGGATTCAC-3'

ERIC2: 5'-TACATTCGAGGACCCCTAAGTC-3'

Para las reacciones de amplificación se emplearon Ready-To-Go PCR-beads (Amersham Pharmacia Biotech). A cada uno de los viales del kit se le añadió 1 µl de cada uno de los cebadores, 1 µl de DNA y 22 µl de agua destilada triestéril. El programa de PCR empleado se muestra en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4.- Protocolo de amplificación de ADN para la técnica ERIC-PCR.

FASE	TEMPERATURA (°C)	DURACIÓN (min)	
Desnaturalización inicial	94	7	
Desnaturalización	90	0.5	35 ciclos
Hibridación	52	1	
Elongación	52	1	
Elongación final	65	8	

c) BOX-PCR:

La BOX-PCR se basa en la amplificación de elementos BOX, que son elementos repetitivos repartidos a lo largo del genoma bacteriano. El cebador empleado fue (Chowdhury y col., 2004):

BOX-PCR: 5' GATCGCCAAGGCGACGCTGACG 3'

Para las reacciones de amplificación las reacciones fueron preparadas de la misma forma que en el caso anterior. El programa de PCR empleado se muestra en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5.- Protocolo de amplificación de ADN para la técnica BOX-PCR.

FASE	TEMPERATURA (°C)	DURACIÓN (min)	
Desnaturalización inicial	94	5	
Desnaturalización	94	1	35 ciclos
Hibridación	60	1	
Elongación	72	1	
Elongación final	72	5	

d) REP-PCR:

La REP-PCR es una técnica de tipificación en la que se utilizan cebadores que hibridan con secuencias de ADN repetidas o repetitivas (secuencias rep) que se encuentran distribuidas en el cromosoma de muchas bacterias y hongos (especialmente en enterobacterias y algunas bacterias grampositivas). Con esta técnica se amplifican las regiones que separan las secuencias rep, por lo que el polimorfismo resulta de la variabilidad en la repetición de dichas secuencias y de la distancia entre copias contiguas causadas por inserciones o deleciones de ADN. Las secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (secuencias REP) y las secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias (secuencias ERIC) son algunas de las secuencias rep que más se han utilizado en estudios epidemiológicos de brotes infecciosos.

La técnica de REP-PCR (secuencias palindrómicas extragénicas) (Stern y col., 1984; Hulton y col., 1991) en las cepas de estudio se llevó a cabo empleando cebadores específicos para estas secuencias repetitivas que se encuentran a lo largo del genoma bacteriano (Versalovic y col., 1991):

REP1R: 5'-IIICGICGICATCIGGC-3'

REP2: 5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'

Para la preparación de las reacciones de amplificación se empleó el mismo protocolo descrito para las técnicas de ERIC y BOX-PCR. El programa de amplificación empleado se muestra en la Tabla 4.6.

Tabla 4.6.- Protocolo de amplificación de ADN para la técnica REP-PCR.

FASE	TEMPERATURA (°C)	DURACIÓN (min)
Desnaturalización inicial	95	7
Desnaturalización	94	1
Hibridación	44	1
Elongación	65	8
Elongación final	65	15

35
ciclos

e) Electroforesis y análisis de los datos:

Los productos de PCR fueron separados por medio de electroforesis horizontal en geles de agarosa (1%) teñidos con bromuro de etidio (Bio-Rad) a 100 v durante 90 min utilizándose un marcador de 50-2000 pb (Sigma, USA) como indicador de la masa molecular. Para el análisis de datos, los geles fueron escaneados y las imágenes capturadas en un sistema informático Gel Doc 2000 (Bio-Rad). Para el análisis y comparación de los patrones se empleó el coeficiente de similitud de Dice (S_d) (Dice, 1945) como medida de la homología:

$$S_d = [2A / (2A + B + C)] \times 100$$

A: número de bandas comunes

B: nº de bandas específicas de primer patrón

C: nº de bandas específicas del segundo patrón

Los dendrogramas obtenidos se crearon en base al parámetro UPGMA (unweighted pair group method average). Además, se realizó también un análisis polifásico introduciendo todos los datos obtenidos en las distintas técnicas y empleando el Software BioNumerics versión 4.0 (Applied Maths, Bélgica).

4.3.- RESULTADOS

4.3.1.- Análisis de proteínas de la envoltura celular:

El análisis de las proteínas de la envoltura celular, tanto totales como de la membrana externa de pared, mediante la técnica de SDS-PAGE reveló un patrón similar para todas las cepas de *E. tarda*, independientemente de su origen geográfico y de hospedador. De hecho, todos los aislados analizados mostraron un perfil con numerosas bandas proteicas comunes entre 120 y 28,9 KDa. En todos los perfiles se pudieron observar, al menos, 6 proteínas mayoritarias en el caso de las proteínas totales y 3 proteínas mayoritarias en las proteínas externas de membrana (Figura 4.1).

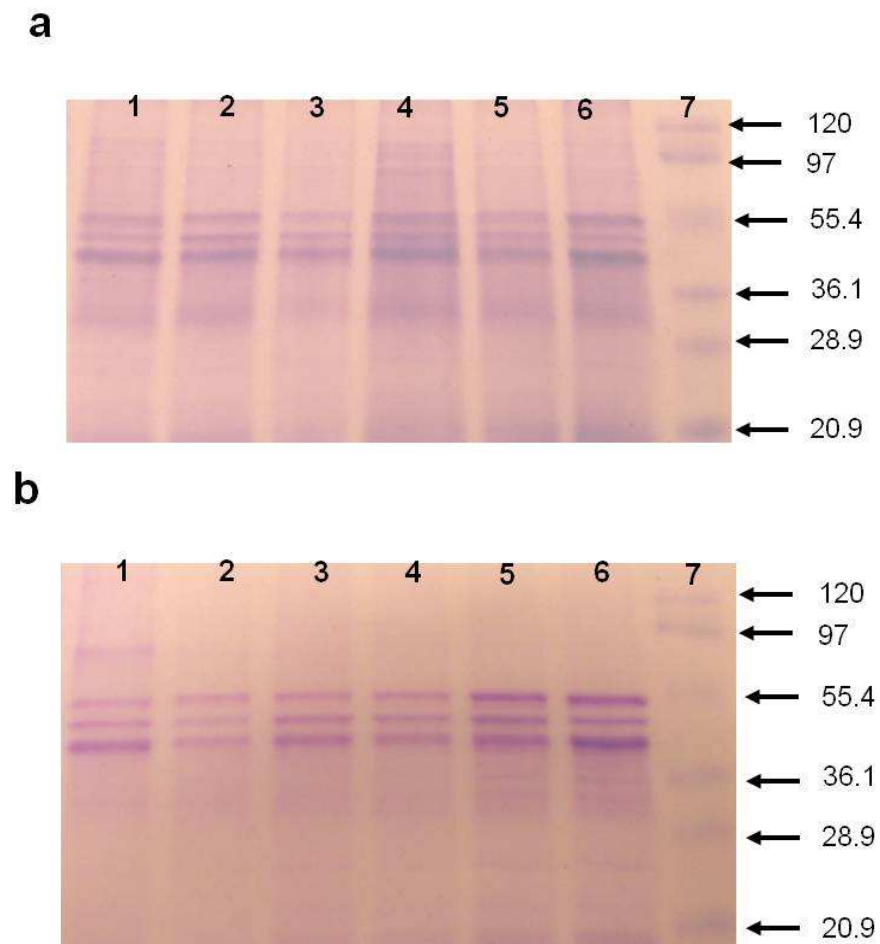


Figura 4.1.- SDS-PAGE de proteínas de membrana totales (a) y externas (b). 1: ACC35.1; 2: HL1.1; 3: RM288.1; 4: 9.8; 5: NCMBB2034; 6: WEF1; 7: marcador de peso molecular. Las flechas indican la masa molecular de las bandas del marcador en KDa.

4.3.2.- Determinación de la composición proteica mediante MALDI-TOF

El perfil proteico obtenido mediante la técnica de MALDI-TOF para las cepas de *E. tarda* estudiadas abarcó, en todos los casos un espectro en la región masa/carga (m/z) comprendido entre los valores aproximados de 3000 y 12000 (Figura 4.2a). Aunque pudimos comprobar la existencia de una elevada homogeneidad entre perfiles, al realizar la correlación de estos perfiles y construir un dendrograma, se formaban dos grupos claramente diferenciados (Figura 4.2b). El grupo más amplio estaba constituido por la mayor parte de los aislados de *E. tarda* analizados integrándose en éste cepas procedentes de distintos orígenes y hospedadores. Todos los aislados de rodaballo formaron parte de este grupo principal. En el segundo "cluster", formado por un menor número de cepas, se encontraban las dos cepas de referencia de *E. tarda* (CETC849 y NCIMB2034), la cepa de pez ángel FL3-22, la cepa de lubina 9.8 y las cepas tipo de las otras dos especies pertenecientes al género *Edwardsiella*: *E. ictaluri* y *E. hoshinae*.

El análisis de los perfiles proteicos dio como resultado valores superiores a 2.3 en todas las cepas, valor asignado para la identificación de especie, lo que nos indica que esta técnica resulta un método útil para la identificación de aislados de *E. tarda*.

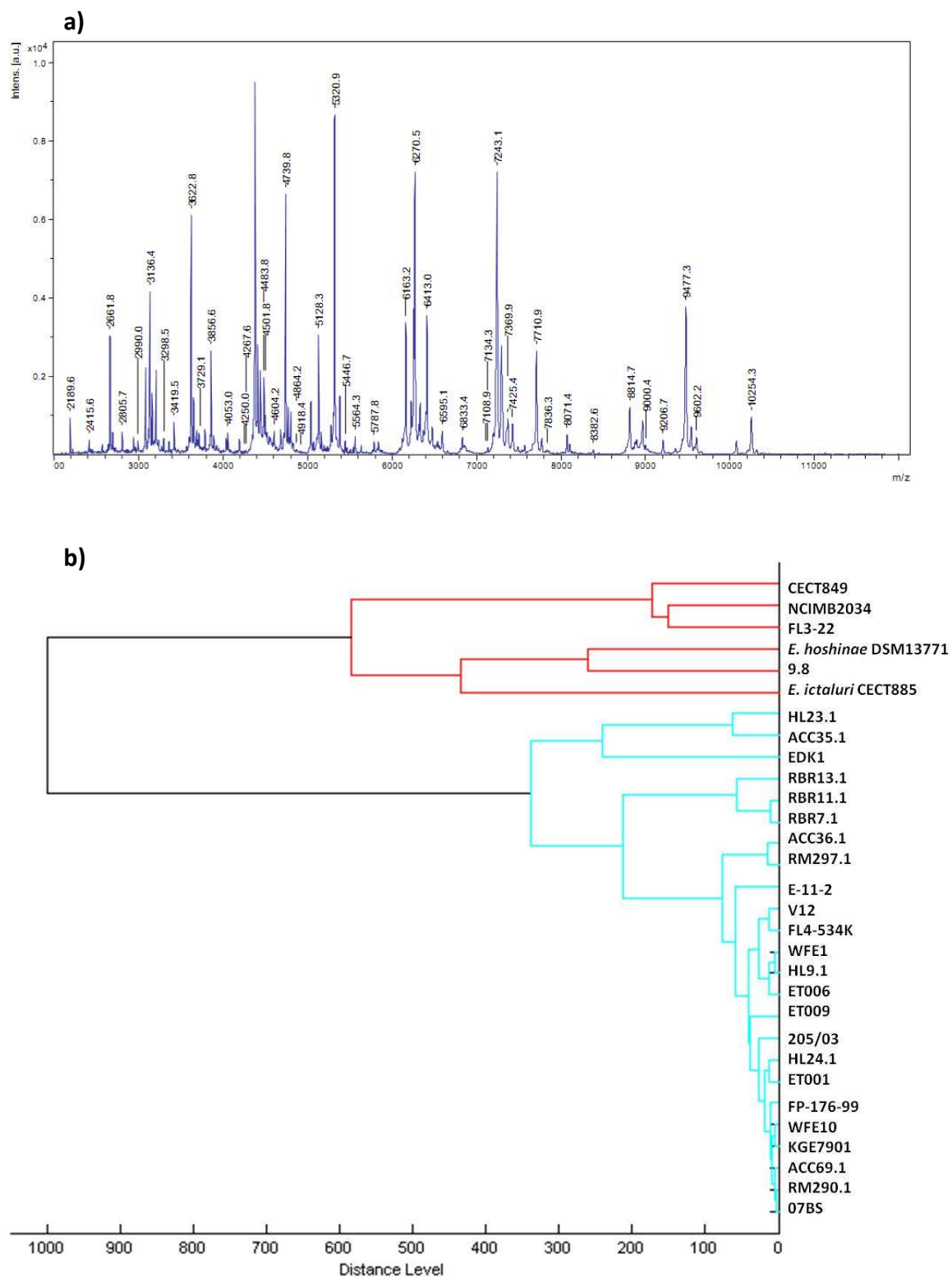


Figura 4.2.- (a) Perfil de proteínas representativo correspondiente a la cepa de *E. tarda* aislada de rodaballo ACC35.1 obtenido mediante la técnica MALDI-TOF; (b) dendrograma realizado con la distancia entre varias cepas de *E. tarda* e incluyendo las cepas de referencia de *E. ictaluri* y *E. hoshinae*.

4.3.3.- Determinación del contenido plasmídico:

Los resultados obtenidos en el análisis del contenido plasmídico de las cepas de *E. tarda* estudiadas, mostraron que todos los aislados de rodaballo, independientemente de su origen geográfico y año de aislamiento, presentaban un patrón idéntico, caracterizado por la presencia de 2 plásmidos, uno de 12 kb y otro más pequeño de aproximadamente 2.5 Kb. Este último es característico de los aislados de rodaballo, ya que está presente en todos ellos y no se encuentra en ninguna de las otras cepas de *E. tarda* estudiadas con fines comparativos (Figura 4.3).

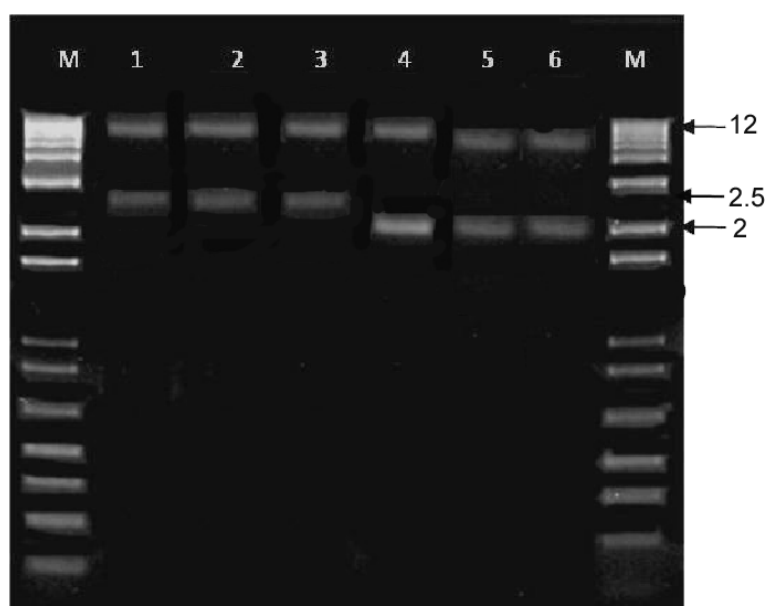


Figura 4.3.- Contenido plasmídico obtenido empleando el sistema de extracción Qiaprep Spin Miniprep (Qiagen). Líneas M: marcador molecular 1 kb (TrackIt™ 1 kb DNA Ladder, Invitrogen); 1 al 3, aislados de rodaballo; 4, cepa 9.8 aislada de lubina americana; 5 y 6: productos de restricción obtenidos en la digestión del plásmido de 12 kb con la enzima EcoRI. Las flechas indican la masa molecular en Kb.

En cuanto a los ensayos de digestión con enzimas de restricción, en el caso del plásmido de mayor tamaño, los mejores resultados en cuanto a número e intensidad de bandas se obtuvieron con la enzima FastDigest EcoRI. Tras la restricción, se observaron dos bandas idénticas en todas las cepas (Figura 4.3), por lo que podemos decir que se trata del mismo plásmido en todos los casos. Sin embargo, cuando se intentó la digestión del plásmido de menor tamaño característico de las cepas de rodaballo, no conseguimos obtener en ningún caso productos de restricción, por lo que no se pudo determinar si este plásmido es el mismo en todas las cepas.

4.3.4.- Estudio de la diversidad genética intraespecífica:

a) RAPD:

Inicialmente, se realizó el análisis RAPD con una única cepa (ACC35.1) empleando los 6 cebadores aportados por el kit comercial. Cuatro de ellos (P3, P4, P5 y P6) generaron patrones apropiados de los productos amplificados y, por lo tanto, fueron los seleccionados para el análisis de la colección completa de las cepas.

Los resultados obtenidos con los cebadores P3 y P6 fueron similares. Ambos cebadores agruparon todas las cepas de rodaballo en un único cluster, presentando todas ellas un idéntico perfil genético (Figuras 4.4 y 4.5) caracterizado por 2 y 3 bandas respectivamente de pesos moleculares aproximados de 1300 y 800 bp (para el cebador P3) y de 2000, 1300 y 900 bp (para el cebador P6). Sin embargo, sí se pudieron establecer diferencias entre el resto de las cepas estudiadas. Mientras que empleando el cebador P3, los aislados de rodaballo compartían el mismo perfil con otras 7 cepas procedentes de otros orígenes, cuando se utilizaba el cebador P6 éste resultaba ser más discriminativo, y los aislados de rodaballo presentaban un perfil único y distinto al del resto de cepas estudiadas.

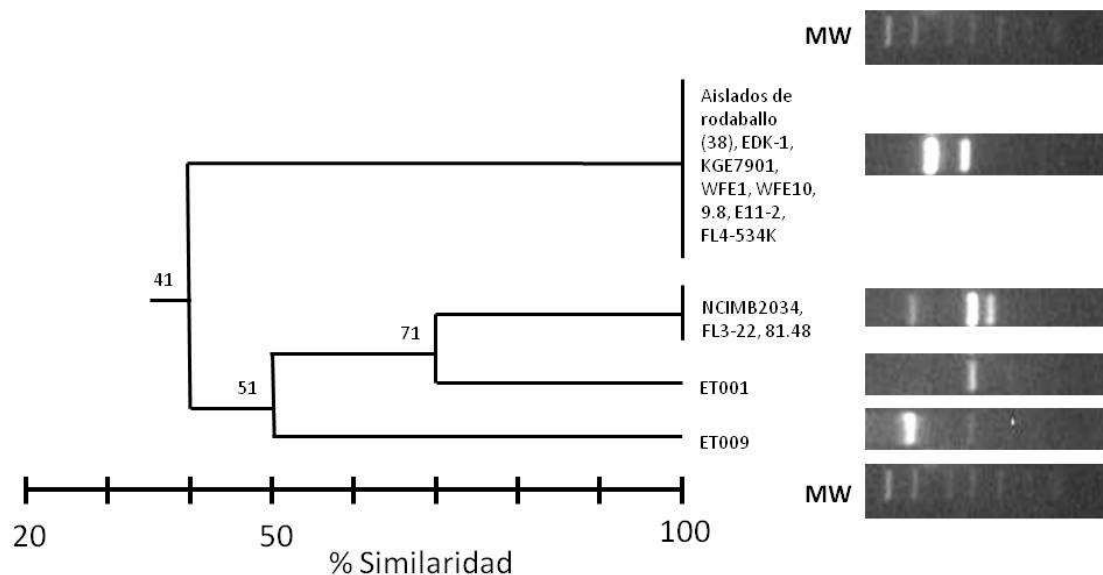


Figura 4.4.- Dendrograma construido a partir de los perfiles obtenidos con la técnica RAPD empleando el cebador P3, el coeficiente de similitud de Dice y el análisis UPGMA. Los números entre paréntesis indican el número de cepas. Los números en las líneas indican % de similitud. En la parte izquierda de la figura se

muestran los perfiles representativos de cada uno de los clusters formados. Los perfiles superior e inferior corresponden al marcador molecular AmpliSize Molecular Ruler (50-2000 bp ladder, Sigma).

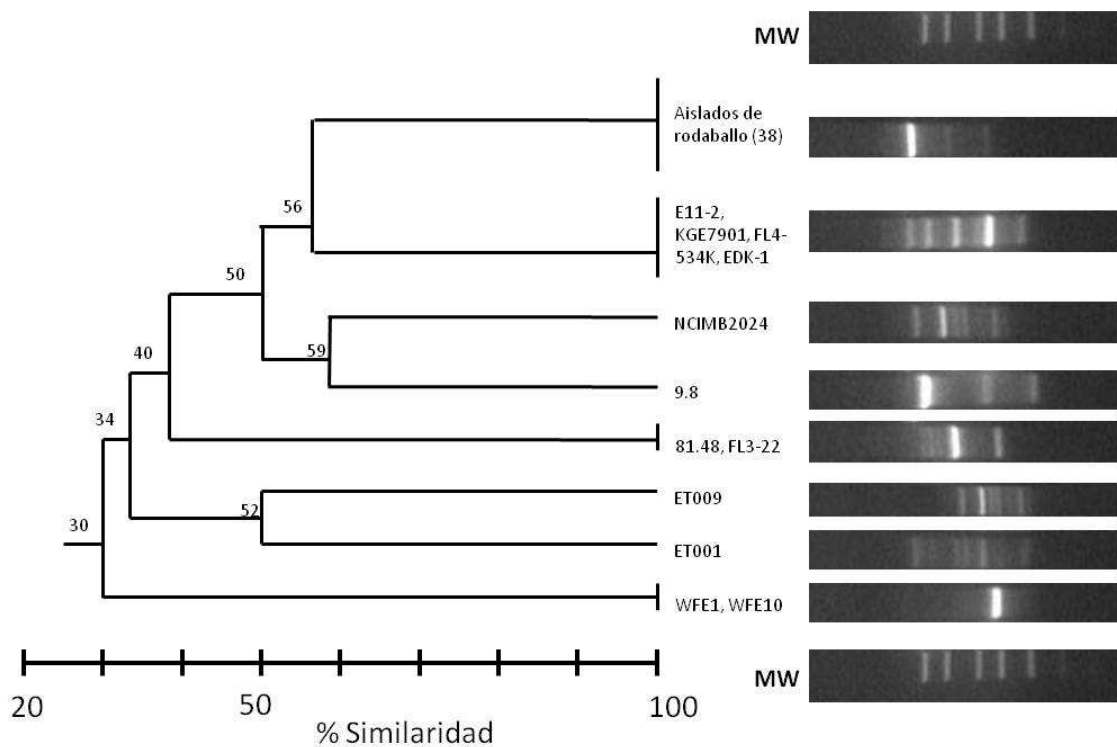


Figura 4.5.- Dendrograma construido a partir de los perfiles obtenidos con la técnica RAPD empleando el cebador P6, el coeficiente de similitud de Dice y el análisis UPGMA. Los números entre paréntesis indican el número de cepas. Los números en las líneas indican % de similitud. En la parte izquierda de la figura se muestran los perfiles representativos de cada uno de los clusters formados. Los perfiles superior e inferior corresponden al marcador molecular AmpliSize Molecular Ruler (50-2000 bp ladder, Sigma).

Los cebadores P4 y P5 fueron los únicos con los que se pudo establecer diferencias dentro de las cepas de *E. tarda* aisladas de rodaballo encontrándose dos grupos distintos. La diferencia entre ambos grupos se basó en la presencia o ausencia de una única banda de 1100 bp para el caso del cebador P4 y de 1700 bp para el caso del cebador P5 (Figuras 4.6 y 4.7). El índice de similitud entre estos dos subgrupos fue del 85 %. Tal y como se muestra en la tabla resumen (Tabla 4.7), ambos clones pudieron detectarse en algunos casos incluso dentro de una misma planta de cultivo, pero nunca dentro de un mismo brote de mortalidad. Resulta interesante que a partir del año 2006 todos los aislados de *E. tarda* de rodaballo pertenecieron al clon II.

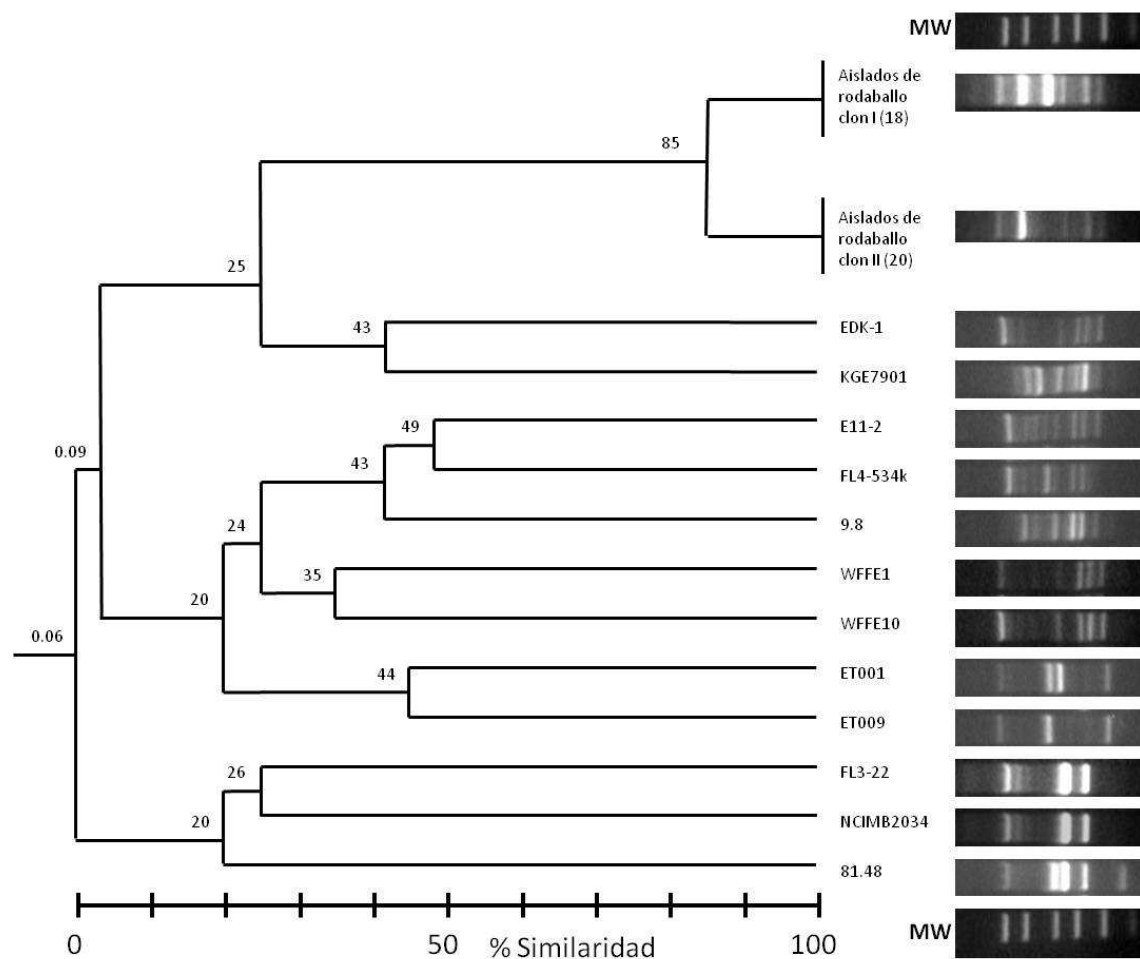


Figura 4.6.- Dendrograma construido a partir de los perfiles obtenidos con la técnica RAPD empleando el cebador P4, el coeficiente de similitud de Dice y el análisis UPGMA. Los números entre paréntesis indican el número de cepas. Los números en las líneas indican % de similitud. En la parte izquierda de la figura se muestran los perfiles representativos de cada uno de los clusters formados. Los perfiles superior e inferior corresponden al marcador molecular AmpliSize Molecular Ruler (50-2000 bp ladder, Sigma).

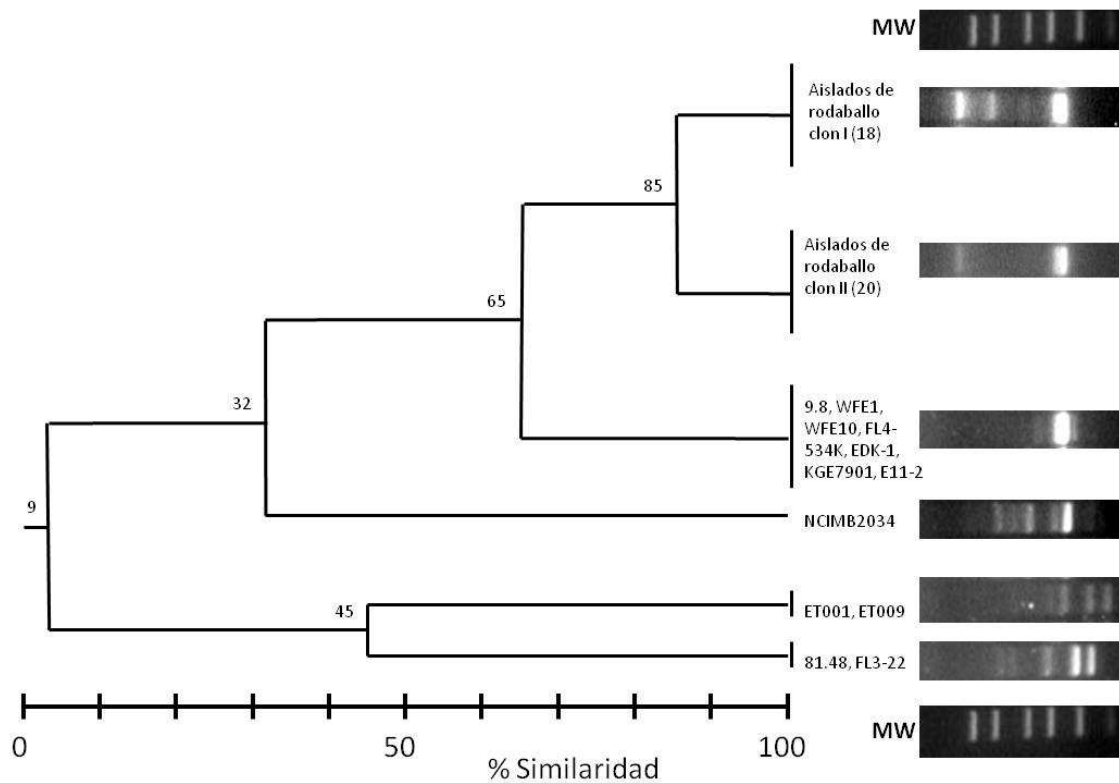


Figura 4.7.- Dendrograma construido a partir de los perfiles obtenidos con la técnica RAPD empleando el cebador P5, el coeficiente de similitud de Dice y el análisis UPGMA. Los números entre paréntesis indican el número de cepas. Los números en las líneas indican % de similitud. En la parte izquierda de la figura se muestran los perfiles representativos de cada uno de los clusters formados. Los perfiles superior e inferior corresponden al marcador molecular AmpliSize Molecular Ruler (50-2000 bp ladder, Sigma).

b) ERIC-PCR:

En el caso de la técnica ERIC-PCR los resultados obtenidos mostraron perfiles idénticos para todos los aislados de rodaballo, al igual que ocurría en el caso del cebador P6 de la técnica RAPD (Figura 4.8). Los resultados obtenidos nos permitieron agrupar todos los aislados de *E. tarda* de rodaballo en un único grupo, mostrando un nivel de similitud entre las todas las cepas del 100%, independientemente de su año y origen geográfico de aislamiento (Tabla 4.7). Los perfiles obtenidos para estos aislados se caracterizan por 4 bandas comprendidas entre 250 y 1500 pb.

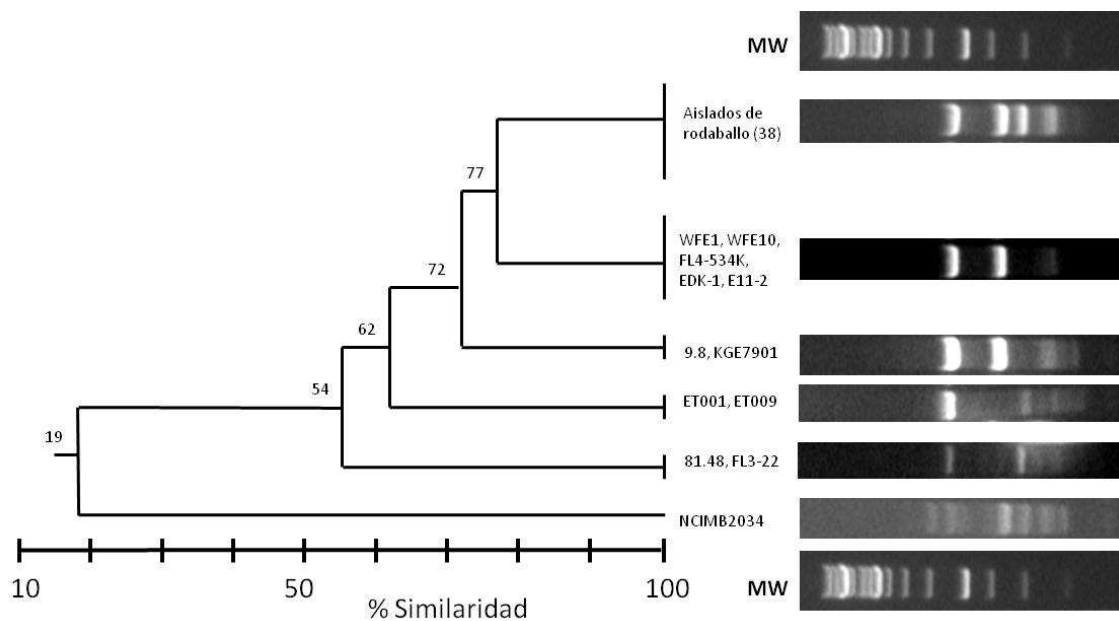


Figura 4.8.- Dendrograma construido a partir de los perfiles obtenidos con la técnica ERIC-PCR, el coeficiente de similitud de Dice y el análisis UPGMA. Los números entre paréntesis indican el número de cepas. Los números en las líneas indican % de similitud. En la parte izquierda de la figura se muestran los perfiles representativos de cada uno de los clusters formados. Los perfiles superior e inferior corresponden al marcador molecular (Gene Ruler 1 Kb DNA ladder; Fermentas).

c) BOX-PCR:

Al igual que en la técnica anterior, con esta técnica de tipado molecular, basada en la amplificación de regiones repetitivas del genoma bacteriano, no se pudieron establecer diferencias dentro de los aislados de rodaballo. Todos ellos mostraron un perfil de bandas idéntico agrupándose dentro de un único cluster con una similitud del 100% (Tabla 4.7). Este grupo era claramente diferente del resto de cepas procedentes de otros orígenes presentando, el grupo más cercano, una similitud del 75% (ver figura 4.9).

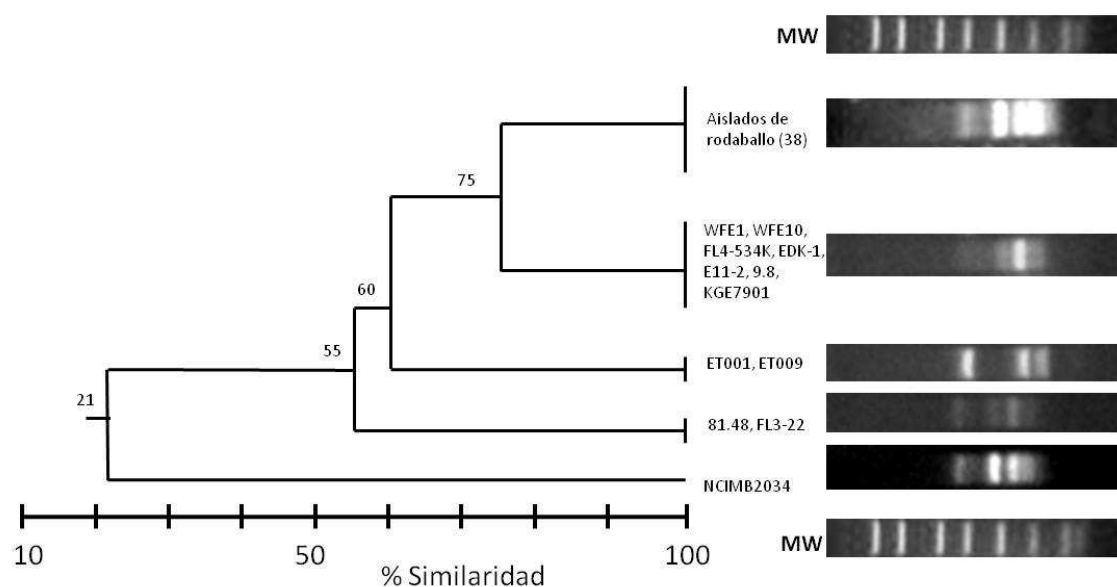


Figura 4.9.- Dendrograma construido a partir de los perfiles obtenidos con la técnica BOX-PCR, el coeficiente de similitud de Dice y el análisis UPGMA. Los números entre paréntesis indican el número de cepas. Los números entre paréntesis indican el número de cepas. Los números en las líneas indican % de similitud. En la parte izquierda de la figura se muestran los perfiles representativos de cada uno de los clusters formados. Los perfiles superior e inferior corresponden al marcador molecular AmpliSize Molecular Ruler (50-2000 bp ladder, Sigma).

d) REP-PCR:

Esta técnica, al igual que la ERIC-PCR y la BOX-PCR también basada en la amplificación de elementos repetitivos del DNA, fue la única de las tres que permitió establecer diferencias entre las cepas aisladas de rodaballo. Al igual que ocurría con los cebadores P4 y P5 en la técnica RAPD, se pudieron detectar dos grupos (ver Figura 4.10). Además, esta técnica resultó ser muy discriminativa, no pudiendo establecer grandes grupos dentro del resto de cepas estudiadas. De hecho, solamente los grupos formados por los aislados de rodaballo estaban formados por más de tres cepas.

El índice de similitud entre los dos grupos de aislados de rodaballo fue del 74%, diferenciándose ambos únicamente en la presencia o ausencia de una única banda de un peso molecular aproximado de 1500 bp. Además, y a diferencia de lo que ocurría en la técnica RAPD (cebadores P4 y P5), en esta ocasión sí se pudo detectar la coexistencia de ambos clones dentro de un mismo brote de mortalidad (Tabla 4.7).

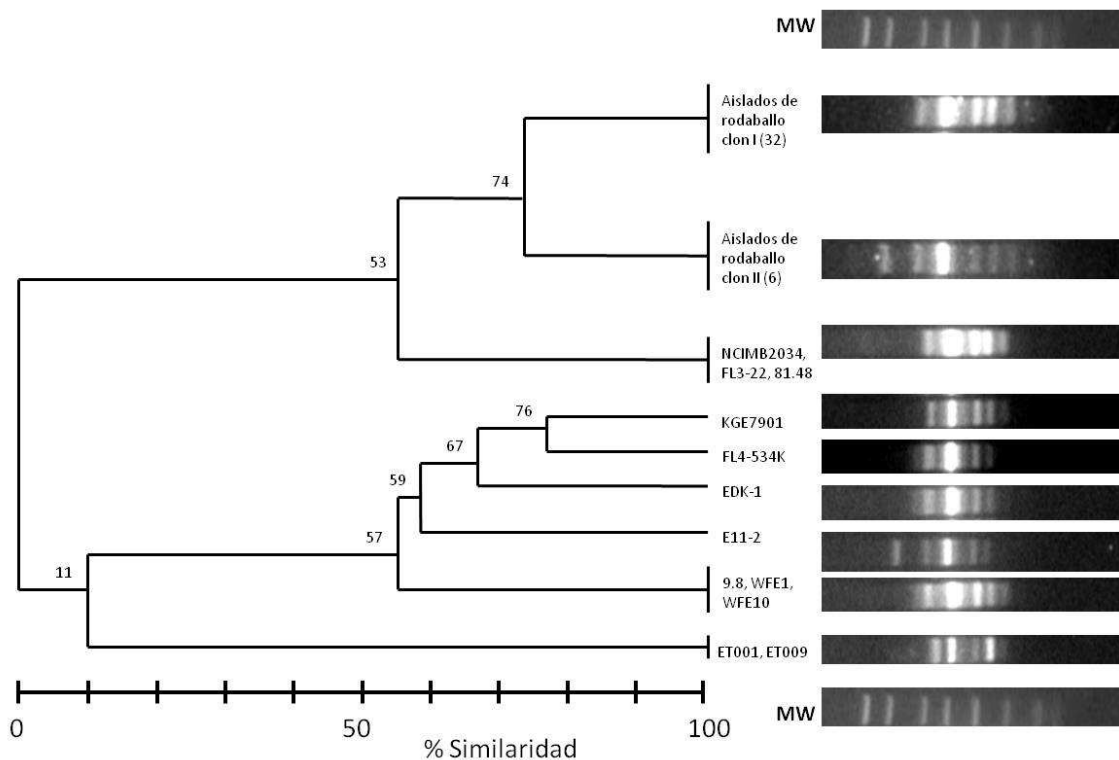


Figura 4.10.- Dendrograma construido a partir de los perfiles obtenidos con la técnica REP-PCR, el coeficiente de similitud de Dice y el análisis UPGMA. Los números entre paréntesis indican el número de cepas. Los números en las líneas indican el número de cepas. Los números en las líneas indican % de similitud. En la parte izquierda de la figura se muestran los perfiles representativos de cada uno de los clusters formados. Los

perfiles superior e inferior corresponden al marcador molecular AmpliSize Molecular Ruler (50-2000 bp ladder, Sigma).

a) Análisis polifásico:

El análisis polifásico de todos los resultados obtenidos empleando las técnicas de tipado molecular dio como resultado el dendrograma mostrado en la Figura 4.11. Se pudo comprobar que todas las cepas de rodaballo se agruparon formando un “cluster” homogéneo. El resto de las cepas de *E. tarda* procedentes de otros orígenes mostraron una mayor distancia entre ellas lo que refleja una mayor variabilidad intraespecífica.

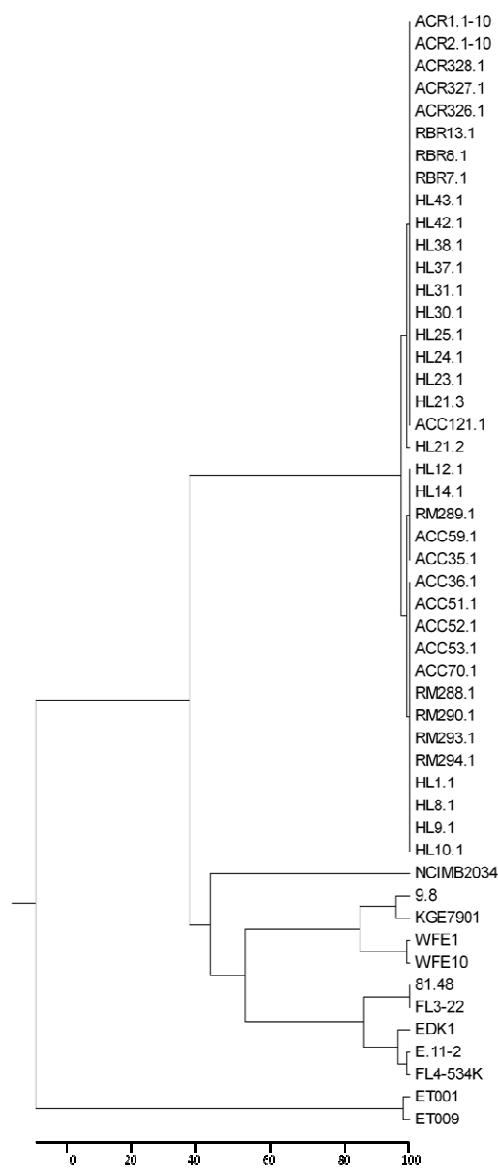


Figura 4.11.- Dendrograma empleando un análisis polifásico introduciendo todos los datos obtenidos en las distintas técnicas y empleando el Software BioNumerics versión 4.0 (Applied Maths, Bélgica). La escala inferior indica la distancia Euclidiana.

Tabla 4.7.- Resumen de los resultados obtenidos para las cepas de *E. tarda* empleando técnicas de tipado molecular. *Origen: S: Sur Europa; N: Norte Europa; A-E: plantas de cultivo; la cifra indica distintos brotes de mortalidad.

CEPA	AÑO	ORIGEN*	GRUPOS MOLECULARES						
			RAPD P3	RAPD P4	RAPD P5	RAPD P6	ERIC	REP	BOX
Aislados de rodaballo									
ACC35.1	2005	SA1	I	I	I	I	I	II	I
ACC36.1	2005	SA1	I	I	I	I	I	I	I
ACC51.1	2006	SA2	I	I	I	I	I	I	I
ACC52.1	2006	SA2	I	I	I	I	I	I	I
ACC53.1	2006	SA2	I	I	I	I	I	I	I
ACC69.1	2006	SA3	I	I	I	I	I	II	I
ACC70.1	2006	SA3	I	I	I	I	I	I	I
ACC121.1	2009	SA4	I	II	II	I	I	I	I
RM288.1	2006	SB1	I	I	I	I	I	I	I
RM289.1	2006	SB1	I	I	I	I	I	II	I
RM290.1	2006	SB1	I	I	I	I	I	I	I
RM293.1	2006	SB1	I	I	I	I	I	I	I
RM294.1	2006	SB1	I	I	I	I	I	I	I
HL1.1	2004	NC1	I	I	I	I	I	I	I
HL8.1	2005	NC2	I	I	I	I	I	I	I
HL9.1	2005	NC2	I	I	I	I	I	I	I
HL10.1	2005	NC2	I	I	I	I	I	I	I
HL12.1	2005	NC3	I	I	I	I	I	II	I
HL14.1	2005	NC3	I	I	I	I	I	II	I
HL21.2	2006	NC4	I	II	II	I	I	II	I
HL21.3	2006	NC4	I	II	II	I	I	I	I
HL23.1	2006	NC5	I	II	II	I	I	I	I
HL24.1	2006	NC5	I	II	II	I	I	I	I
HL25.1	2006	NC5	I	II	II	I	I	I	I
HL30.1	2006	NC5	I	II	II	I	I	I	I
HL31.1	2006	NC5	I	II	II	I	I	I	I
HL37.1	2006	NC6	I	II	II	I	I	I	I
HL38.1	2006	NC6	I	II	II	I	I	I	I
HL42.1	2006	NC7	I	II	II	I	I	I	I
HL43.1	2006	NC7	I	II	II	I	I	I	I
RBR7.1	2008	SD1	I	II	II	I	I	I	I
RBR8.1	2008	SD1	I	II	II	I	I	I	I
RBR13.1	2008	SD2	I	II	II	I	I	I	I
ACR326.1	2009	SE1	I	II	II	I	I	I	I
ACR327.1	2009	SE1	I	II	II	I	I	I	I
ACR328.1	2009	SE1	I	II	II	I	I	I	I
ACR1.1-10	2010	SE2	I	II	II	I	I	I	I
ACR2.1-10	2010	SE2	I	II	II	I	I	I	I
Otros aislados									
E.11-2	ND	Japón	I	V	III	II	II	VII	II
EDK1	ND	Japón	I	III	III	II	II	VI	II
9.8	1986	U.S.A.	I	VII	III	IV	III	VIII	II
FL4-534K	1997	U.S.A.	I	VI	III	II	II	V	II
WFE1	2002	Japón	I	VIII	III	VIII	II	VIII	II
WFE10	2002	Japón	I	IX	III	VIII	II	VIII	II
ET001	2002	Japón	III	X	V	VII	IV	IX	III
ET009	2002	Japón	IV	XI	V	VII	IV	IX	III
KGE7901	ND	Japón	I	IV	III	II	III	IV	II
81.48	ND	U.S.A.	II	XIV	VI	V	V	III	IV
FL3-22	ND	U.S.A.	II	XII	VI	V	V	III	IV
NCIMB2034	1977	NCIMB	II	XIII	IV	III	VI	III	V

4.4.- DISCUSIÓN

A pesar de la gran cantidad de publicaciones existentes hasta la actualidad dedicadas a distintos aspectos del estudio de *E. tarda*, no son muchos los trabajos centrados en el estudio de su composición proteica, plasmídica o el empleo de técnicas moleculares para la determinación de variaciones genéticas dentro de esta especie.

En cuanto a los estudios de proteínas de envoltura celular mediante la técnica de SDS-PAGE, se pudo observar una alta homogeneidad entre todas las cepas de *E. tarda* ensayadas. Los perfiles de proteínas obtenidos mediante SDS-PAGE, mostraron un patrón muy similar para todas las cepas estudiadas, independientemente de su origen geográfico y de hospedador, tanto para las proteínas totales como para las de membrana externa de pared. Esta homogeneidad contrasta con la heterogeneidad descrita por otros autores para este patógeno (Maiti y col., 2009), si bien, sí coinciden los pesos de las proteínas principales observadas.

En cuanto a los resultados obtenidos con la técnica MALDI-TOF, en todos los casos se llegó a la identificación de especie empleando la base de datos originada por el software. Con el dendrograma obtenido se comprobó que se formaban dos grupos diferenciados dentro de las cepas analizadas. El primero de los grupos, compuesto por mayor número de cepas, estaba formado íntegramente por aislados de *E. tarda*, procedentes de distintos orígenes geográficos y de hospedador y entre los cuales se encontraban todas las cepas de rodaballo. Por otra parte, el segundo de los grupos, estaba formado solamente por cuatro cepas de *E. tarda* (las dos cepas de referencia, una aislada de lubina y la de pez ángel) y las dos cepas de referencia correspondientes a las otras especies que forman el género *Edwardsiella*: *E. ictaluri* y *E. hoshinae*. Los resultados obtenidos parecen indicar que el género *Edwardsiella* presenta una composición de proteínas conservada para todas sus especies, aunque con diferencias suficientes como para que esta técnica sea eficaz en la identificación de *E. tarda*.

En las pocas referencias que existen sobre el estudio del contenido plasmídico de *E. tarda*, se describe una elevada diversidad intraespecífica, existiendo cepas que no presentan plásmidos, frente a otras en las que sí se ha descrito la presencia de un pequeño número de ellos variando su peso

entre 3 y 185 Kb. En cuanto a las cepas procedentes de rodaballo, Xiao y col (2009) describieron la presencia de un plásmido de 23.7 Kb presente en la mayoría de los aislados de rodaballo incluidos en su estudio. En el análisis del contenido plasmídico de las cepas de *E. tarda* realizado en el presente estudio, hemos demostrado la presencia de dos plásmidos, uno de 12 Kb y otro de aproximadamente 2,5 Kb. El segundo plásmido de menor tamaño resultó ser único y característico de los aislados de rodaballo incluidos en ese trabajo. Este hecho, puede resultar de gran trascendencia en estudios posteriores tanto a nivel epidemiológico como del posible papel que este plásmido pudiese jugar en la elevada virulencia que presentan estos aislados. Sin embargo, los estudios preliminares realizados no han permitido obtener ningún tipo de información sobre él. Serán necesarios futuros estudios de caracterización de este plásmido para poder determinar si juega un papel importante en el mecanismo de virulencia de este patógeno.

Los resultados obtenidos en los estudios de variabilidad genética intraespecífica empleando técnicas de tipado molecular realizados en esta tesis, podrían resultar de gran importancia en la identificación de posibles clones dentro de este patógeno bacteriano asociados con determinados factores como podrían ser el origen geográfico, hospedador, virulencia, etc... Los métodos de caracterización basados en la técnica de PCR están siendo empleados en los últimos años como técnicas rápidas, de bajo coste, robustas y que permiten establecer diferencias entre especies bacterianas o, incluso, entre cepas de una misma especie.

La técnica de RAPD ha sido comúnmente utilizada en estudios de tipado molecular de bacterias ya que permite el análisis comparativo de los genomas entre diferentes aislados de la misma especie (Magariños y col., 2000; O'Hici y col., 2000). En base a los resultados obtenidos, pudimos encontrar la existencia de dos líneas clonales distintas dentro de las cepas de rodaballo, que difieren entre sí un 85% (Figuras 4.6 y 4.7). Ambos grupos pudieron detectarse tanto en plantas situadas en el Norte de Europa como en el Sur de Europa, si bien, desde el 2006 ha sido el clon II el único que se ha detectado en todas las cepas aisladas. Por otro lado, se determinó que ambos clones podían existir dentro de una misma planta de cultivo, pero no se pudo detectar su coexistencia dentro de un mismo brote de mortalidad (Tabla 4.7). Esta técnica fue empleada anteriormente en *E. tarda* por Nucci y col. (2002) para establecer diferencias entre aislados de humanos y peces. Obtuvieron dos clusters que podían asociarse en la mayoría de los casos al origen de las cepas, por lo que establecieron que esta técnica podía resultar válida para establecer el posible origen de los

aislados. Sin embargo, en el presente trabajo se ha comprobado que, al menos dentro de los aislados de rodaballo, empleando los cebadores P3 y P6 no se encuentran diferencias y con los cebadores P4 y P5 los dos grupos que se detectaron no pudieron asociarse con ningún factor como el origen geográfico, el año de aislamiento, etc...

De las tres técnicas empleadas en este trabajo basadas en la amplificación de elementos repetitivos, solamente dos de ellas: ERIC-PCR y BOX-PCR habían sido empleadas anteriormente con cepas de *E. tarda*. Fueron Maiti y col. en el 2008 y 2009 los que, en dos trabajos distintos, encontraron que estas técnicas presentaban poder discriminativo para las cepas de *E. tarda*, y que, por lo tanto, eran herramientas útiles para la realización de futuros estudios epidemiológicos. Sin embargo, en este trabajo, con ninguna de las dos técnicas pudimos establecer diferencias dentro de los aislados de rodaballo, formando todos ellos un único grupo con una similaridad del 100%.

Con respecto al REP-PCR, esta es la primera referencia a la utilización de esta técnica en cepas de *E. tarda* aisladas del ambiente. Los resultados muestran que REP-PCR permite diferenciar dentro de las cepas de *E. tarda* aisladas de rodaballo y se pudieron establecer dos grupos que diferían entre sí un 74%. El clon I estaba formado por un mayor número de cepas que el II y ambos pudieron detectarse dentro de un mismo brote de mortalidad (Tabla 4.7).

El análisis polifásico empleando los resultados obtenidos en todas las técnicas de tipado molecular (Figura 4.11) confirmó que todos los aislados de rodaballo forman un grupo homogéneo independientemente de su origen geográfico. Esta homogeneidad contrasta con la elevada diversidad observada en el resto de cepas de *E. tarda* procedentes de otros orígenes.

En resumen, a pesar de que todos los resultados mostrados en esta sección de caracterización molecular parecen indicar que las cepas aisladas de rodaballo presentan un elevado índice de homogeneidad, formando un grupo compacto, se pudieron establecer pequeñas diferencias genéticas dentro de ellas empleando las técnicas de RAPD (cebadores P4 y P5) y REP-PCR. Así, estas técnicas podrían resultar de gran utilidad a la hora de la realización de futuros estudios epidemiológicos de la edwardsielosis en rodaballo.

DAO prepress abstract - doi: 10.3354/dao02363

Intraspecific genetic variability of *Edwardsiella tarda* strains from cultured turbot

N. Castro*, A. E. Toranzo, A. Bastardo, J. L. Barja, B. Magariños

*Email: nuria.castro@usc.es

ABSTRACT: *Edwardsiella tarda* is an enterobacterial fish pathogen that causes mortalities in different fish species worldwide. In this study, we analyzed the intraspecific variability in a collection of *E. tarda* strains isolated from turbot employing four PCR-based methods: random amplified polymorphic DNA (RAPD), enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR (ERIC-PCR), repetitive extragenic palindromic-PCR (REP-PCR) and BOX-PCR. *E. tarda* isolates from different hosts were also included for comparison. *E. tarda* strains from turbot showed high molecular homogeneity when RAPD (primers P3 and P6), ERIC-PCR and BOX-PCR were employed. However, with REP-PCR and RAPD (primers P4 and P5) techniques, different genetic groups could be established within these isolates using either technique. The two RAPD types presented an 85% similarity and were different from those obtained with REP-PCR which had a 74% similarity. Based on the results obtained, although a high genetic homogeneity was found in turbot isolates, the RAPD test (with primers P4 and P5) and REP-PCR could discriminate within these strains and are therefore considered the most appropriate typing methods for studies of edwardsiellosis in turbot.

[DAO Home](#) | [DAO Forthcoming](#) | [Close Window](#)

1

2

3 **Intraspecific genetic variability of *Edwardsiella tarda* strains from cultured turbot**

4

5 N. Castro*, A.E. Toranzo, A. Bastardo, J.L. Barja and B. Magariños

6 Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Biología – CIBUS -

7

Instituto de Acuicultura

8 Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, 15782 Spain.

9

Corresponding author e-mail: nuria.castro@usc.es

10

Corresponding author telephone: +34 981563100 ext 16959

11

12 **Abbreviated running headline:** Intraspecific diversity of *E. tarda* from turbot13 **Correspondence*:** Nuria Castro Iglesias

14

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de

15

Biología-CIBUS, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago

16

de Compostela, 15782 Spain.

17

E-mail: nuria.castro@usc.es

18

Telephone: +34 981563100 ext 16959

19

20 **Abstract**

21 *Edwardsiella tarda* is an enterobacterial fish pathogen that causes mortalities in
22 different fish species worldwide. In this study, we analyzed the intraspecific variability
23 in a collection of *E. tarda* strains isolated from turbot employing four PCR-based
24 methods: random amplified polymorphic DNA (RAPD), enterobacterial repetitive
25 intergenic consensus-PCR (ERIC-PCR), repetitive extragenic palindromic-PCR (REP-
26 PCR) and BOX-PCR. *E. tarda* isolates from different hosts were also included for
27 comparison. *E. tarda* strains from turbot showed high molecular homogeneity when
28 RAPD (primers P3 and P6), ERIC-PCR and BOX-PCR were employed. However, with
29 REP-PCR and RAPD (primers P4 and P5) techniques, different genetic groups could be
30 established within these isolates using either technique. The two RAPD types presented
31 an 85% similarity and were different from those obtained with REP-PCR which had a
32 74% similarity. Based on the results obtained, although a high genetic homogeneity was
33 found in turbot isolates, the RAPD test with primers P4 and P5 and REP-PCR could
34 discriminate within these strains being therefore the most appropriate typing methods
35 for studies of edwardsiellosis in turbot.

36

37 **Keywords:** *Edwardsiella tarda*, turbot, genetic variability, molecular typing.

38

39 **INTRODUCTION**

40 *Edwardsiella tarda* is a member of the family *Enterobacteriaceae* and the causative
41 agent of edwardsiellosis, a bacterial disease that represents a serious problem to
42 aquaculture, affecting mainly catfish (*Ictalurus punctatus*), eel (*Anguila japonica*) and
43 flounder (*Paralichthys olivaceus*). In recent years, it has also caused high economic
44 losses in turbot (*Psetta maxima*) cultures in Europe (Castro et al., 2006) and is

2

45 considered one of the most important emergent pathogens. Although it is described that
46 this bacterium is biochemically homogeneous (Austin & Austin 1999; Castro et al.
47 2006), antigenic studies revealed that all *E. tarda* strains isolated from turbot constitute
48 an homogeneous group different to *E. tarda* isolates from other fish species (Castro et
49 al. 2006). Several studies (Yamada and Wakabayashi, 1998; Nucci et al., 2002; Acharya
50 et al., 2007; Maiti et al., 2008, 2009) have used molecular based methods for
51 intraespecific characterization of *E. tarda* although none of them included isolates from
52 turbot.

53 The determination of Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) patterns has
54 been successfully employed for discrimination within bacterial strains in diverse species
55 (Romalde et al. 1999; Magariños et al. 2000; Romalde, 2005). In the case of *E. tarda*,
56 Nucci et al. (2002) applied this technique to a collection of isolates from fish and human
57 and found that RAPD could distinguish, with a few exceptions, isolates from human and
58 fish origin. Moreover, preliminary studies of Castro et al. (2006) employing the RAPD
59 technique in a group of 21 *E. tarda* isolates from turbot, showed the existence of two
60 genetic groups within the turbot isolates coexisting in the same rearing facility.

61 Repetitive element sequence-based polymerase chain reaction fingerprinting (rep-PCR)
62 is shown to be a valuable tool for classifying and typing a variety of Gram-negative and
63 several Gram-positive genera. Three categories of conserved repetitive sequences are
64 used for bacterial typing: the enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence
65 (ERIC), the repetitive extragenic palindromic sequence (REP) and the BOX element.
66 Often, the three categories are used in combination in order to achieve better
67 discrimination. ERIC₂- and REP-PCR has been successfully used to differentiate
68 bacterial strains from diverse species (Bennasar et al. 2002; Bruant et al. 2003; Hahm et
69 al. 2003). Until now, only Maiti et al. (2009) employed ERIC-PCR to differentiate

70 among *E. tarda* isolates from pond sediments. BOX-PCR has been applied in numerous
71 taxonomic studies on plant-associated, environmental, medical and food-associated
72 bacteria (Taqao et al., 2005; Marques et al., 2008). In *E. tarda*, Maiti et al. (2008)
73 compared this technique with PCR-ribotyping employing isolates from freshwater
74 ponds and apparently healthy fish finding that the BOX-PCR was the most
75 discriminative.

76 In this work, RAPD, ERIC-PCR, REP-PCR and BOX-PCR methods have been
77 employed simultaneously to analyze the intraspecific genetic variability within *E. tarda*
78 strains causing mortalities in cultured turbot, with the aim of evaluating these
79 techniques as useful epidemiological tools for this bacterial pathogen.

80

81 MATERIALS AND METHODS

82 **Bacterial strains.** A collection of 38 *E. tarda* strains, isolated from turbot in different
83 outbreaks and years and in five diverse rearing facilities, situated in two areas of Europe
84 (one in North Europe and four in South Europe) (Table 1) were analyzed. In addition,
85 12 *E. tarda* strains, isolated from other fish hosts, were included in this study for
86 comparison.

87 All strains were characterized employing classical biochemical tests as well as
88 commercial miniaturized system API 20E (Biomérieux, France) and slide agglutination
89 with specific antiserum (Castro et al. 2006). Moreover, confirmatory identification of
90 the isolates as *E. tarda* was performed by a PCR protocol using the specific primers
91 EtfD (Castro et al. 2010) which amplify a 445bp sequence of the fimbrial gene. All
92 strains were routinely grown on Trypticase Soy Agar (Pronadisa, Spain) supplemented
93 with 1% of NaCl (TSA-1) at 25° C for 24 h. Cultures were maintained frozen at -80 °C
94 | in Criobille tubes (AES Laboratory, Lyon, France).

95 **DNA extraction.** Chromosomal DNA was extracted using the InstaGene Matrix
96 (BioRad, Spain) following the manufacturer's recommendations. Extracted DNA was
97 maintained at -30°C until used for PCR reactions. Three different DNA extractions were
98 performed for each bacterial strain and from three different culture plates.

99 **PCR typing analysis.** The RAPD reactions were performed using Ready-To-Go RAPD
100 Analysis Beads (Amersham Pharmacia Biotech, Spain) containing buffer, nucleotides
101 and Taq DNA polymerase. Each RAPD bead was resuspended in 19 µl of sterile water
102 and 1 µl of purified bacterial DNA and 25 pmol of respective primer (Amersham
103 Pharmacia Biotech, Spain) were added. The amplification protocol for RAPD analysis
104 started with denaturation (95°C for 1 min) followed by 30 cycles at 95°C for 1 min
105 (denaturation), 52°C for 1 min (annealing) and 72°C for 2 min with a final step of 72°C
106 for 5 min. ERIC, REP and BOX amplifications were carried out with Ready-to-go PCR
107 beads (Amersham Pharmacia Biotech, Spain). These commercial beads have been
108 optimized for PCR reactions and contain buffer, nucleotides and Taq DNA polymerase;
109 therefore, the only reagents added to the reaction were template DNA (1 µl), primers
110 (100 pmol each) and sterile distilled water to complete a final volume of 25 µl. The
111 primers employed for REP-PCR, ERIC-PCR and BOX-PCR were described by
112 Versalovic et al. (1994) and Chowdhury et al. (2004) respectively.

113 The amplification protocol for ERIC-PCR consisted of an initial denaturation step at
114 95°C for 5 min followed by 35 cycles of denaturation (92°C for 45 s), annealing (52°C
115 for 1 min) and extension (70°C for 10 min), with a final extension step at 70°C for 20
116 min. In the case of REP-PCR, an initial denaturation at 95°C for 7 min followed by 35
117 cycles of denaturation at 92°C for 45 s, annealing at 40°C for 1 min and elongation at
118 72°C for 15 min. The final extension step was performed at 72°C for 15 min. For BOX-
119 PCR the program consisted of an initial denaturation step at 94°C for 5 min followed by

120 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 60°C for 1 min and extension
121 at 72°C for 1 min, with a final extension step at 72°C for 5 min.

122 All the amplifications were performed simultaneously in a T Gradient Thermocycler
123 (Biometra, Goettingen, Germany) and a Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburg)
124 instrument. As negative control, sterile distilled water instead of bacterial DNA was
125 included with each set of reactions.

126 In all cases, amplification products were analyzed by horizontal 1,5% (w/vol) agarose
127 gels with TAE (0.04 M Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH=8.0) electrophoresis buffer.
128 After staining with ethidium bromide, gels were photographed under UV light.
129 AmpliSize Molecular Ruler (50-2000 bp ladder, Sigma, Spain) and a GcncRuler™ 1 kb
130 DNA Ladder, ready-to-use, (250-10,000 bp ladder, Fermentas) were employed as
131 molecular weight markers.

132 **Computer-assisted analysis of genomic fingerprints.** All gels were scanned and
133 images were captured by a Gel Doc-2000 gel documentation system (Bio-Rad, Spain).
134 For the analysis and comparison of patterns, data analysis was performed by using
135 Diversity Database software (Bio-Rad, Spain). The computed similarities among
136 isolates were estimated by means of the Dice coefficient (Dice 1945). Dendograms
137 were produced using the unweighted pair group method average (UPGMA). Moreover,
138 a composite tree was generated using a combined data set of all genotypic data and
139 using the software package BioNumerics version 4.0 (Applied Maths, Sint-Martens-
140 Latem, Belgium).

141

142

143

144

145 **RESULTS AND DISCUSSION**

146 Since 2004 *E. tarda* has become one of the most important emerging pathogens in
147 cultured turbot in Europe causing serious economic losses (Castro et al. 2006; Toranzo
148 2007). Despite several studies of *E. tarda* in turbot, genetic characterization of these
149 isolates employing molecular typing techniques has not been developed in depth. The
150 intraspecific typing of *E. tarda* could be of great importance in the study of variants of
151 this fish pathogen associated with geographical area, host origin, virulence and disease
152 outbreak.

153 In this study we proposed the evaluation of 4 PCR-based methods for detecting
154 intraspecific variation within a collection of *E. tarda* strains from turbot: RAPD, ERIC-
155 PCR, REP-PCR and BOX-PCR, frequently employed as molecular tools for rapid
156 typing of microorganisms (Magariños et al. 2000; Khan et al. 2002; Romalde, 2005;
157 Rodriguez et al. 2006; Mancuso et al. 2007).

158 Biochemical, serological and PCR analyses confirmed that the 46 isolates studied were
159 *E. tarda* strains belonging to the wildtype biogroup (data not shown).

160 Previous results employing RAPD technique showed that in *E. tarda* isolates from
161 turbot only the oligonucleotides P3, P4, P5 and P6 generated reproducible patterns with
162 an appropriate number of amplified products suitable for an accurate analysis (Castro et
163 al. 2006). Based on these data, these four primers were selected to analyze the complete
164 collection of strains.

165 | When oligonucleotides P3 and P6 were employed, all *E. tarda* turbot strains were
166 | placed together in the same group (Table 1). However primer P6, but not P3, enabled
167 | separation of the turbot strains from those isolated from other fish species.

168 Oligonucleotides P4 and P5 (Fig. 1a and 1b) were the only ones that could discriminate
169 within the turbot isolates. With these primers two different groups were obtained, which

170 differed in a unique band of 1100 bp (with primer P4) and 1700 bp (with primer P5)
171 approximately. These two RAPD types present 85% of similarity (Fig. 1a and 1b).
172 These results are in agreement with those previously reported by Castro et al. (2006).
173 As is illustrated in table 1, although in this work the two RAPD groups were detected in
174 some cases in a same rearing facility, they never coexisted in the same disease outbreak,
175 each outbreak being caused by a single group. Interestingly, after 2006 group II was the
176 predominant, corresponding all the strains isolated after this year to this group. In
177 addition, in the present work we report for the first time the existence of the RAPD type
178 II in farms situated in Southern Europe.

179 The ERIC-PCR and BOX-PCR techniques were employed by Maiti et al. in 2008 and
180 2009 in comparative studies of *E. tarda* strains and were found to be discriminative and
181 potential tools for future epidemiological studies. However these methods did not allow
182 differentiation within *E. tarda* turbot strains in the present study but did separate turbot
183 isolates from strains from other fish hosts (table 1).

184 With regard to the REP-PCR, to our knowledge, this is the first report of the application
185 of this molecular typing method to *E. tarda* strains isolated from environment. Our
186 results demonstrated that this technique could discriminate within turbot strains,
187 showing the existence of two different groups with a similarity of 74% between them
188 which only differed in a unique band of 1500 bp approximately (Fig. 2). In contrast to
189 the two genetic groups identified by RAPD, the two groups identified by REP-PCR
190 coexisted in the same outbreak (Table 1).

191 Reproducibility of ERIC-PCR, REP-PCR, BOX-PCR and RAPD-PCR results was
192 assessed by repetition in at least 3 independent assays. Excluding some variations in
193 band intensity, no differences were observed among profiles obtained for each strain,
194 and all band patterns proved to be highly reproducible.

195 Data obtained in all molecular typing methods were employed to develop a single
196 similarity matrix that was used to generate a cumulative dendrogram (Fig. 3). The
197 results confirmed the turbot *E. tarda* isolates are a highly homogeneous group,
198 regardless of their origin. Interestingly, this homogeneity strongly contrasts with the
199 heterogeneity observed among the strains from other sources.

200 In summary, the evaluation of four PCR based techniques for the study of the
201 intraspecific genetic diversity of *E. tarda* from turbot demonstrated that although a low
202 genetic variability was present within these isolates, the RAPD assay employing
203 primers P4 and P5 and REP-PCR method are the most appropriate as typing methods in
204 *E. tarda* from this marine fish.

205

206 **Acknowledgements**

207 This work was supported in part by Grants 08MMA018E and AGL2009-08859 from
208 Xunta de Galicia and Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain) respectively.

209

210 **References**

211 Acharya M., N.K. Maiti, S. Mohanty, P. Mishra and M. Samanta (2007) Genotyping of
212 *Edwardsiella tarda* isolated from freshwater fish culture system. Comp Immunol Microbiol
213 Infect Dis 30: 33-40.

214 Austin B and Austin DA (1999) Characteristics of the diseases. In Austin B and Austin DA
215 (eds) Bacterial fish pathogens: diseases of farmed and wild fish pp. 13-15. Heidelberg:
216 Springer-Verlag.

217 Bennasar A, Luna G, Cabrer B and Lalucat J (2002) Rapid identification of *Salmonella*
218 *typhimurium*, *S. enteritidis* and *S. virchow* isolates by polymerase chain reaction based
219 fingerprinting methods. Int Microbiol 3: 31-38.

- 220 Bruant G, Watt S, Quentin R and Rosenau A (2003) Typing of non-encapsulated *Haemophilus*
221 strains by repetitive-element sequence-based PCR using intergenic dyad sequence. J Clin
222 Microbiol 41: 3473-3480.
- 223 Castro N, Toranzo AE, Barja JL, Núñez S and Magariños B (2006) Characterization of
224 *Edwardsiella tarda* strains isolated from turbot, *Psetta máxima* (L.). J Fish Dis 29: 541-547.
- 225 Castro N, Toranzo AE, Núñez S, Osorio CR and Magariños B (2010) Evaluation of four
226 polymerase chain reaction primer pairs for the detection of *Edwardsiella tarda* in turbot. Dis
227 Aquat Organ 90: 55-61.
- 228 Chowdhury SP, Khanna S, Verma SC and Tripathi AK (2004) Molecular diversity of tannic and
229 degrading bacteria isolated from tannery soil, J Appl Microbiol 97: 1210–1219.
- 230 Dice LR (1945) Measures of the amount of ecological association between species. Ecology 26:
231 297-302.
- 232 Hahm BK, Maldonado Y, Schreiber E, Bhunia AK and Nakatsu CH (2003) Subtyping of
233 foodborne and environmental isolates of *Escherichia coli* by multiplex-PCR, Rep-PCR, PFGE,
234 ribotyping and AFLP. J Microbiol 53: 387-399.
- 235 Khan A, McCarthy S, Wang RF and Cerniglia CE (2002) Characterization of United States
236 outbreak isolates of *Vibrio parahaemolyticus* using enterobacterial repetitive intergenic
237 consensus (ERIC) PCR and development of a rapid PCR method for detection of O3:K6
238 isolates. FEMS Microbiol Lett 206: 209-214.
- 239 Magariños B, Toranzo AE, Barja JL and Romalde JL (2000) Existence of two geographically-
240 linked clonal lineages in the bacterial fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*
241 evidence by random amplified polymorphic DNA analysis. Epidemiol Infect 125: 213-219.
- 242 Maiti NK, Mandal A, Mohanty S and Samanta M (2008) Comparative analysis of genome of
243 *Edwardsiella tarda* by BOX-PCR and PCR-ribotyping. Aquaculture
244 280: 60-63.

- 245 Maiti NK, Mandal A, Mohanty S and Mandal RN (2009) Phenotypic and genetic
246 characterization of *Edwardsiella tarda* isolated from pond sediments. *Comp Immunol Microbiol*
247 *Infect Dis* 32: 1-8.
- 248 Mancuso M, Avendaño-Herrera R, Zacccone R, Toranzo AE and Magariños B (2007) Evaluation
249 of different DNA-based fingerprinting methods for typing *Photobacterium damsela* ssp.
250 *piscicida*. *Biol Res* 40: 85-92.
- 251 Marques ASA, Marchaison A, Gardan L, and Samson R (2008) BOX-PCR-based identification
252 of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae* - *P. viridiflava* group. *Genet Mol*
253 *Biol* 31: 106-115.
- 254 Nucci C, da Silveira WD, da Silva Correa S, Nakazato G, Bando SY, Ribeiro MA and Pestana
255 de Castro AF (2002) Microbiological comparative study of isolates of *Edwardsiella tarda*
256 isolated in different countries from fish and humans. *Vet Microbiol* 89: 29–39.
- 257 Rodriguez JM, López-Romalde S, Beaz R, Alonso MC, Castro D and Romalde JL (2006)
258 Molecular fingerprinting of *Vibrio tapetis* strains using three PCR-based methods: ERIC-PCR,
259 REP-PCR and RAPD. *Dis Aquat Organ* 69: 175-183.
- 260 Romalde JL, Magariños B, Villar C, Barja JL and Toranzo AE (1999) Genetic analysis of turbot
261 pathogenic *Streptococcus parauberis* strains by ribotyping and random amplified polymorphic
262 DNA. *FEMS Microbiol Lett* 179: 297 – 304.
- 263 Romalde JL, (2005) Application of DNA fingerprinting techniques to the study of fish and
264 shellfish pathogens. In: M.M. Read (eds) *Trends in DNA Fingerprinting Research* pp. 163-191.
265 Nova Science Publishers Inc., New York.
- 266 Tacao M, Alves A, Saavedra MJ and Correia A (2005) BOX-PCR is an adequate tool for typing
267 *Aeromonas* spp. *Antoine-van-Leeuwenhoek* 88:173-179.
- 268 Versalovic J, Schneider M, de Bruijn FJ and Lupski JR (1994) Genomic fingerprinting of
269 bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). *Meth Cell Mol Biol* 5: 25-40.
- 270 Yamada Y and Wakabayashi H (1998) Enzyme electrophoresis, catalase test and PCR-RFLP
271 analysis for the typing of *Edwardsiella tarda*, *Fish Pathol.* 33: 1–5.

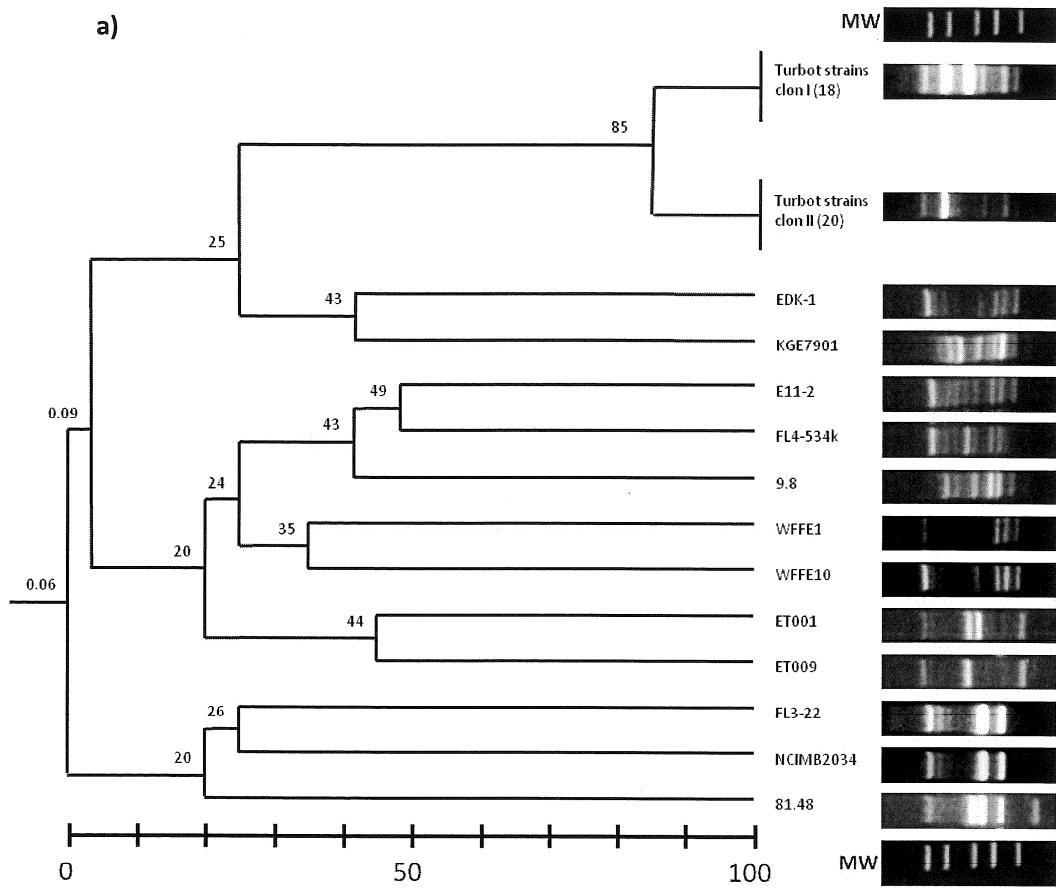
- 272 Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA and Tingey SV (1990) DNA polymorphisms
273 amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18: 6531–6535.

Table 1.- Summary of differentiation among *E. tarda* isolates from turbot using molecular typing methods. *Origin description: S: South Europe; N: North Europe; A to E: farms; number indicates different outbreaks.

STRAIN	YEAR	HOST	ORIGIN*	MOLECULAR GROUPS										REP	BOX	
				RAPD P3	RAPD P4	RAPD P5	RAPD P6	ERIC	ERIC	ERIC	ERIC	ERIC	ERIC			
Turbot Strains																
ACC35.1	2005	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	SA1	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I
ACC36.1	2005	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	SA1	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
ACC51.1	2006	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	SA2	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
ACC52.1	2006	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	SA2	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
ACC53.1	2006	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	SA2	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
ACC69.1	2006	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	SA3	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I
ACC70.1	2006	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	SA3	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
ACC121.1	2009	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	SA4	I	II	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
RM288.1	2006	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	SB1	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
RM289.1	2006	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	SB1	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I
RM290.1	2006	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	SB1	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
RM293.1	2006	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	SB1	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
RM294.1	2006	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	SB1	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
HL1.1	2004	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	NC1	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
HL8.1	2005	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	NC2	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
HL9.1	2005	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	NC2	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
HL10.1	2005	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	NC2	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
HL12.1	2005	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	NC3	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I
HL14.1	2005	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	NC3	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I
HL21.2	2006	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	NC4	I	II	I	II	II	II	II	II	II	II	II	II	I
HL21.3	2006	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	NC4	I	II	I	II	II	II	II	II	II	II	II	II	I
HL23.1	2006	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	NC5	I	II	I	II	II	II	II	II	II	II	II	II	I
HL24.1	2006	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	NC5	I	II	I	II	II	II	II	II	II	II	II	II	I
HL25.1	2006	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	NC5	I	II	I	II	II	II	II	II	II	II	II	II	I
HL30.1	2006	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	NC5	I	II	I	II	II	II	II	II	II	II	II	II	I
HL31.1	2006	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	NC6	I	II	I	II	II	II	II	II	II	II	II	II	I
HL37.1	2006	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	NC6	I	II	I	II	II	II	II	II	II	II	II	II	I
HL38.1	2006	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	NC6	I	II	I	II	II	II	II	II	II	II	II	II	I
HL42.1	2006	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	NC7	I	II	I	II	II	II	II	II	II	II	II	II	I
HL43.1	2006	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	NC7	I	II	I	II	II	II	II	II	II	II	II	II	I
RBR7.1	2008	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	SD1	I	II	I	II	II	II	II	II	II	II	II	II	I
RBR8.1	2008	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	SD1	I	II	I	II	II	II	II	II	II	II	II	II	I
RBR13.1	2008	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	SD2	I	II	I	II	II	II	II	II	II	II	II	II	I
ACR326.1	2009	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	SE1	I	II	I	II	II	II	II	II	II	II	II	II	I

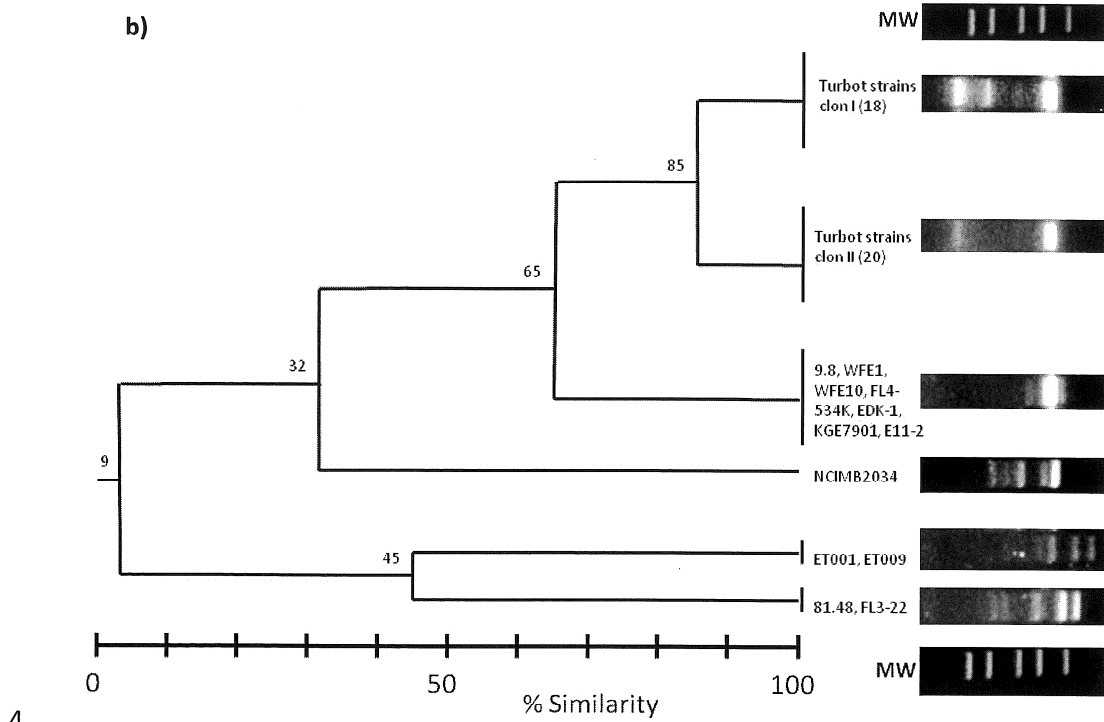
ACR327.1	2009	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	SE1	I	II	II	I	I	I	I	I
ACR328.1	2009	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	SE1	I	II	II	I	I	I	I	I
ACR1.1-10	2010	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	SE2	I	II	II	I	I	I	I	I
ACR2.1-10	2010	Turbot (<i>Psetta maxima</i>)	SE2	I	II	II	I	I	I	I	I
Reference Strains											
E.11-2	ND	Japanese eel (<i>Anguilla japonica</i>)	Japan	I	V	III	II	II	II	II	II
EDK1	ND	Japanese eel (<i>Anguilla japonica</i>)	Japan	I	III	III	II	II	II	II	II
9.8	1986	Striped Bass (<i>Morone saxatilis</i>)	U.S.A.	I	VII	III	IV	III	VIII	VIII	II
FL4-534K	1997	Striped Bass (<i>Morone saxatilis</i>)	U.S.A.	I	VI	III	II	II	V	V	II
WFE1	2002	Japanese flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	Japan	I	VIII	III	VIII	II	VIII	VIII	II
WFE10	2002	Japanese flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	Japan	I	IX	III	VIII	II	VIII	VIII	II
ET001	2002	Red Sea Bream (<i>Pagellus bogaraveo</i>)	Japan	III	X	V	VII	IV	IX	IX	III
ET009	2002	Red Sea Bream (<i>Pagellus bogaraveo</i>)	Japan	IV	XI	V	VII	IV	IX	IX	III
KG7901	ND	Tilapia (<i>Tilapia nilotica</i>)	Japan	I	IV	III	II	III	IV	IV	II
81.48	ND	Catfish (<i>Ictalurus punctatus</i>)	U.S.A.	II	XIV	VI	V	V	III	III	IV
FL3-22	ND	Angel fish	U.S.A.	II	XII	VI	V	V	III	III	IV
NCIMB2034	1977	Fish (unknown specie)	NCIMB	II	XIII	IV	III	VI	III	III	V

1



2

3

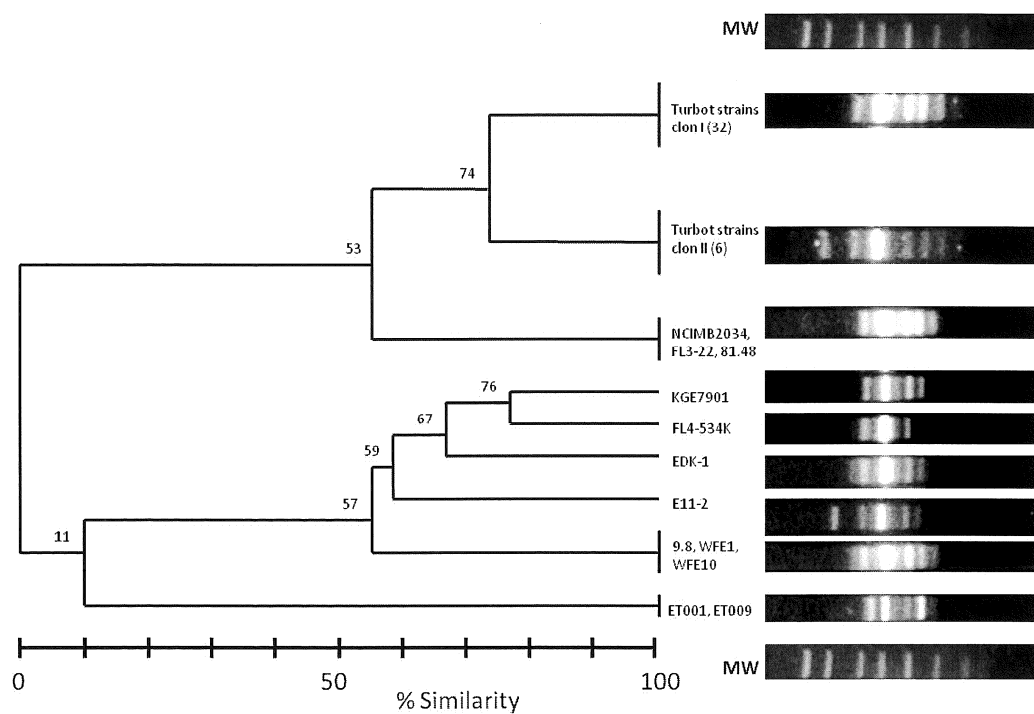


4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18

Fig. 1.- Dendrogram obtained using Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR profiles employing primer P4 (a) and P5 (b) and using Dice similarity coefficient and UPGMA analysis. Numbers in brackets: number of strains. Numbers in nodes: % similarity. Representative patterns of strains are shown next to each group. Upper and lower profiles (MW): AmpliSize Molecular Ruler (50-2000 bp ladder, Sigma).

19

20

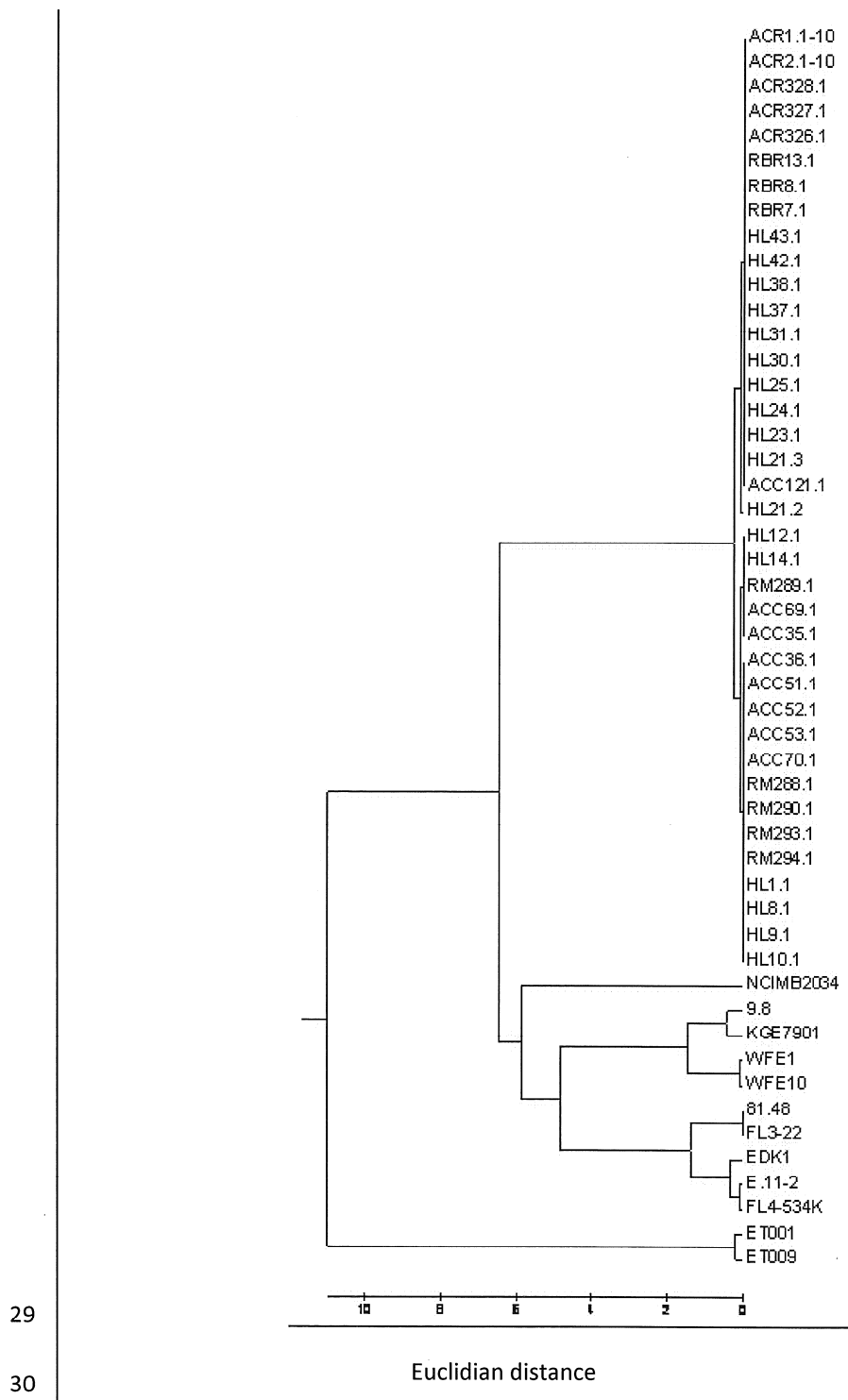


21

22

23 Fig. 2.- Dendrogram obtained using Repetitive extragenic palindromic PCR (REP-PCR) profiles
 24 and using Dice similarity coefficient and UPGMA analyses. Numbers in brackets: number of
 25 strains. Numbers in nodes: % similarity. Representative patterns of strains are shown next to
 26 each group. Upper and lower profiles (MW): AmpliSize Molecular Ruler (50-2000 bp ladder,
 27 Sigma).

28



29
30
31 Fig. 3.- Composite tree generated using combined data for *E. tarda* isolates from turbot from
32 all the molecular typing methods tested in this work and using the software package
33 BioNumerics.

Sección 5

Estudios de patogenicidad y factores de virulencia

5.1.- INTRODUCCIÓN

5.1.1.- Estudios de virulencia previos en *E. tarda*:

En los numerosos estudios que se han publicado sobre diferentes aspectos de la especie *E. tarda*, pueden encontrarse descripciones de cepas virulentas y no virulentas (Han y col., 2006; Wang Y. y col., 2010). A pesar de que ambos tipos son capaces de invadir células *in vitro*, solamente las cepas virulentas tienen la capacidad de entrar en el interior del pez en cantidades suficientes a través del mucus, branquias y/o el tracto gastrointestinal, y multiplicarse en los órganos internos, causando la muerte (Ling y col., 2000). En aquellos trabajos en los que se ha estudiado la virulencia de diferentes aislados de *E. tarda*, podemos encontrar valores variables de Dosis Letal 50 (LD₅₀) dependiendo de las cepas y de la especie de pez empleada en los ensayos.

Al comienzo de la realización de esta tesis, no se había publicado ningún estudio en el que se hubiesen realizado experimentos de cálculo de la Dosis Letal 50 (LD₅₀) empleando cepas aisladas de rodaballo. Posteriormente, en los años 2008 y 2009 se publicaron algunos trabajos en los que se daban valores de LD₅₀ comprendidos entre $3,9 \times 10^1$ CFU/g y 3×10^3 CFU/g para cepas aisladas de rodaballo en China (Lan y col., 2008; Wang Y. y col., 2009b; Xiao y col., 2009). Con estos datos, y tal y como se describe en estas publicaciones, todo parecía indicar que *E. tarda* podría ser una de las especies bacterianas con mayor potencial virulento para el rodaballo.

5.1.2.- Factores de virulencia descritos en *E. tarda*:

Los factores de virulencia se refieren a las propiedades que contribuyen a que un patógeno infecte y dañe los tejidos del hospedador, de modo que la virulencia en sí puede deberse a uno o múltiples factores. Estos son importantes para que las bacterias invadan y colonicen rápidamente el tejido, alcanzando unos altos niveles de población antes de que la respuesta de dicho hospedador limite el crecimiento bacteriano.

La patogénesis de *E. tarda* es multifactorial. Hasta hoy, sus mecanismos son poco conocidos y tampoco se conoce exactamente la vía de entrada en el hospedador. Se supone que, probablemente, el intestino y las lesiones en la piel son lugares por donde el patógeno puede obtener una vía de entrada. Son varios los factores de virulencia que, se ha sugerido, contribuyen a la patogénesis de *E. tarda*. Entre ellos: producción de dermatotoxinas y hemolisinas, la habilidad de resistir la capacidad fagocítica del suero, la capacidad de invadir células epiteliales, etc... (Srinivasa Rao y col., 2003).

La capacidad de *E. tarda* para adherirse y penetrar en las células epiteliales ha sido estudiada por varios autores (Janda y col., 1991; Strauss y col., 1997; Ling y col., 2000). Marques y col. (1984) describieron la capacidad de *E. tarda* para invadir células HeLa (una línea de células epiteliales obtenida a partir de un carcinoma humano) y detectaron la producción de β -hemolisina. Los aislados obtenidos a partir de peces son capaces de invadir células de la línea continua EPC (epitelioma papuloso de carpa) *in vitro*, lo que sugiere que las patologías invasivas observadas en especies de peces cultivadas pueden estar relacionadas con esta propiedad (Ling y col., 2000). Existen multitud de estructuras de la superficie bacteriana con función en la movilidad y adherencia que podrían ser de gran importancia para el inicio del proceso de infección como el pilus P (genes *pap*), las fimbrias tipo 1 (genes *fim*), etc... Varios autores (Janda y col., 1991; Ling y col., 2000) han sugerido que la capacidad de invasión de las células por *E. tarda* podría ser un proceso dependiente de microfilamentos y de la proteína tirosina quinasa que puede inhibirse empleando citocalasina D y genisteína.

En la mayoría de las bacterias patógenas invasivas se ha comprobado que el aumento de la concentración de hierro en el hospedador implica una mayor susceptibilidad a la infección. Esto hace que la capacidad de captación de este elemento constituya uno de los principales factores de virulencia de los microorganismos patógenos. Hasta la actualidad, se conoce poco sobre los mecanismos de captación de hierro de *E. tarda*. Kokubo y col. (1990) y Dhaenens y col. (1999) publicaron que *E. tarda* posee un sistema de captación de hierro mediado por sideróforos el cual es necesario para su supervivencia dentro del hospedador. Además, se han encontrado dos genes regulados por la proteína Fur ("ferric uptake regulator") (Janda & Abbott, 1993b; Hirono y col., 1997). Estos genes codifican, respectivamente, la hemolisina EthA y su proteína secretora EthB. Esta expresión se inhibe bajo condiciones de exceso de hierro y se activa en condiciones limitantes de hierro lo que permitiría la liberación de hierro a la sangre.

Otro factor de virulencia es el “quorum sensing”. Se trata de un mecanismo de control de la expresión génica dependiente de la densidad celular. Este fenómeno es el responsable de que un conjunto de células independientes, bajo la generación de señales extracelulares, desarrolle comportamientos sociales coordinados. En el caso de un microorganismo patógeno, este fenómeno le permite alcanzar un nivel de población lo suficientemente elevado como para que, llegado el momento de producir los factores de virulencia, pueda contrarrestar las defensas del huésped e invadir otras regiones de ese organismo. Por ello, el “quorum sensing” juega un importante papel en la patogénesis de algunas especies bacterianas. Zhang y col. (2008) y Han y col. (2010) encontraron indicios de actividad “quórum” en *E. tarda*, describiendo que la actividad del sistema regulador 2 (AI2, Auto Inducer 2) era controlada, al menos en parte, por la expresión del gen *luxS* y la existencia de AHLs (N-acylhomoserin lactonas). Ambos autores sugirieron que las rutas y genes relacionados con el “quorum sensing” de *E. tarda*, podrían regular la producción de determinados factores relacionados con su virulencia como la expresión de genes asociados al sistema de secreción tipo III (TTSS), la formación de biofilms, producción de exotoxinas, etc...

Wang Q. y col. publicaron en el 2009 (Wang Q. y col., 2009a) la secuencia completa del genoma de una cepa virulenta, inmóvil y multiresistente a agentes quimioterápicos, aislada de rodaballo en China. En su trabajo, describieron un importante número de genes que muy posiblemente puedan estar relacionados con la virulencia de esta cepa.

En este apartado se ha evaluado el grado de virulencia de los aislados de rodaballo, con el fin de determinar hasta qué punto estas cepas podrían constituir un peligro para las poblaciones de peces en cultivo. Se comprobó también su posible virulencia para animales homeotermos y si podrían suponer un factor de riesgo de futuras zoonosis. Ya que la detección de los genes de virulencia es un paso crucial para elucidar el mecanismo implicado en su patogénesis, realizamos también un estudio encaminado a la identificación de determinados genes que pudieran estar implicados en la virulencia de *E. tarda*.

5.2.- MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1.- Estudios de virulencia en peces:

Los ensayos de virulencia se realizaron mediante infecciones experimentales de 9 cepas representativas de *E. tarda* empleando diferentes rutas. Los aislados utilizados, su origen y hospedador, se muestran en la tabla 5.1. En los ensayos se emplearon alevines de rodaballo, lenguado y lubina de aproximadamente 10 g que se analizaron previamente mediante métodos bacteriológicos (Thoesen, 1994), con el objeto de confirmar la ausencia de patógenos que pudiesen interferir en los experimentos.

Previamente a los ensayos, los peces se aclimataron durante 2-3 días en tanques conteniendo 10 l de agua de mar. Dichos tanques estaban provistos de aireación continuada y se mantuvieron a la temperatura a la que posteriormente realizó el ensayo (15º o 18º C).

Tabla 5.1.- Cepas de *E. tarda* empleadas en los ensayos de virulencia.

CEPA	HOSPEDADOR	ORIGEN
ACC35.1	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Sur Europa
HL1.1	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Norte Europa
RM288.1	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Sur Europa
ACC69.1	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Sur Europa
KGE 7901	Tilapia (<i>Tilapia nilotica</i>)	Japón
E-11-2	Anguila (<i>Anguilla japonica</i>)	Japón
9.8	Lubina americana (<i>Morone saxatilis</i>)	USA
WFE 1	Platija (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	Japón
ET006	Besugo (<i>Pagellus bogaraveo</i>)	Japón

a) Inoculación intraperitoneal (i.p.):

Los ensayos de inoculación intraperitoneal (i.p.) se realizaron empleando alevines de rodaballo, lenguado y lubina y siguiendo los procedimientos descritos por Toranzo y col. (1983).

La preparación de los inóculos se realizó a partir de cultivos bacterianos de las cepas de *E. tarda* en TSA-1, resuspendiendo las bacterias en SS y ajustando a una concentración inicial de aproximadamente $1,2 \times 10^9$ cel/ml por comparación de la turbidez de la suspensión con el tubo 4 de la escala McFarland. La determinación real del número de unidades formadoras de colonias (CFU) presentes en el inóculo se realizó mediante la siembra en placas de TSA-1 de diluciones decimales seriadas en SS de la suspensión inicial. Las diferentes dosis (suspensiones conteniendo entre 10^1 y 10^6 cel/ml) se inocularon a razón de 0.1 ml por pez, empleando 10 peces por dosis. Como lote control se emplearon el mismo número de peces inoculados con SS estéril. Los peces inoculados se mantuvieron, durante la realización del ensayo, en tanques de 10 l con aireación constante y a 18° C.

Con el fin de determinar la posible influencia de la temperatura en la virulencia de *E. tarda*, se realizaron también dos ensayos adicionales de inoculación por i.p. con alevines de rodaballo: el primero consistió en inoculaciones experimentales a 15° C y el segundo, en experimentos de “choque térmico” en los que se sometió a los peces a un aumento brusco de temperatura. Para ello, después de los 10 primeros días del ensayo en los que se mantuvieron los peces a 15° C, se elevó la temperatura a 18° C y se mantuvieron los rodaballos a esta temperatura durante los 10 días posteriores.

b) Inoculación por baño:

En el caso de la inoculación por baño, se emplearon igualmente lotes de 10 peces (rodaballos y lenguados) en tanques de 10 l de agua de mar, mantenidos con aireación constante y a 18° C durante los 20 días que duraron los experimentos.

La preparación del inóculo fue similar a lo descrito anteriormente. En cuanto al método de inoculación de los peces, éstos fueron expuestos durante 1 hora a diferentes diluciones de la bacteria

en el agua de mar de los tanques, de modo que las concentraciones finales estuvieran comprendidas entre 10^2 y 10^6 cel/ml. Transcurrido este tiempo, se procedió a cambiar en su totalidad el agua de mar de los tanques, manteniendo a los peces en los mismos durante todo el experimento. En todos los ensayos se incluyeron como control un número igual de peces a los cuales se adicionó en el agua de cultivo SS estéril y se manipularon de la misma forma que los infectados.

c) Inoculación por cohabitación:

Este último ensayo se realizó empleando alevines de rodaballo y, al igual que en los casos anteriores, los peces se mantuvieron en tanques de 10 l con aireación constante y a 18° C. de temperatura, y la preparación del inóculo fue similar a lo ya descrito anteriormente.

Para la inoculación de los peces se emplearon lotes de 15 peces cada uno, de los cuales 5 fueron inoculados por i.p. con una dosis del orden de 10^4 cel/ml de la cepa ensayada y mantenidos en el mismo tanque que los 10 restantes durante toda la duración del experimento. Para la identificación de los peces inoculados por i.p. se empleó como marca el corte parcial de la aleta caudal. Como lote control se emplearon 15 peces de los cuales 5 fueron inoculados con SS estéril.

d) Estudios de virulencia en animales homeotermos:

Además de los ensayos de virulencia en peces, también se emplearon ratones como especie representativa de los animales homeotermos. En todos los ensayos se emplearon ratones BALB/C de 4-5 semanas (20-25 g de peso) que se inocularon siguiendo la metodología descrita por Daily y col. (1981). Los ratones se mantuvieron en jaulas a temperatura ambiente durante el experimento. La preparación del inóculo fue similar al descrito para los alevines de rodaballo. Los ratones fueron inyectados intraperitonealmente a razón de 0,2 ml de suspensión bacteriana (entre 10^6 y 10^9 cel/ml) por animal empleando 5 ratones por dosis. Como controles negativo y positivo se inocularon el mismo número de ratones inyectados con SS y con la cepa CDC 2227-81 de *Ph. damselae* subsp. *damselae* (Osorio y col., 2000a) respectivamente. La duración del experimento fue de 15 días y las cepas se consideraron virulentas si presentaban una LD₅₀ menor o igual a 10^7 CFU/ml.

e) Cálculo de la Dosis Letal 50 (LD₅₀):

En todos los ensayos de virulencia los peces y ratones fueron observados diariamente hasta 20 días después de la primera mortalidad. La aparición de lesiones o hemorragias y las bajas por mortalidad se consideraron producidas por la cepa inoculada solamente en el caso de que ésta fuese reaislada en cultivo puro a partir de órganos internos (hígado y/o riñón) de los animales afectados.

En todos los casos, el grado de virulencia se expresó como la Dosis Letal 50 (LD₅₀) o dosis necesaria para matar el 50% de los animales inoculados en un tiempo determinado. Su cálculo se realizó en base al método de Reed & Muench (1938):

$$LD_{50} = \text{Log}_{\text{dosis que mata más de 50\%}} \left[\frac{\%mortalidad >50\% - 50}{\%mortalidad >50\% - \%mortalidad <50\%} \right]$$

5.2.2.- Detección de genes implicados en la patogénesis de *E. tarda*:

Teniendo en cuenta diferentes aspectos conocidos de la patogénesis bacteriana como la invasión, degradación de compuestos de la matriz extracelular, adhesión, captación de hierro, detección de quorum y sistemas de secreción de proteínas, se procedió a seleccionar diferentes genes candidatos que podrían participar en cada uno de los aspectos enumerados (Tabla 5.2).

El genoma completo de la cepa de *E. tarda* EIB202, disponible en la base de datos GenBank (número de acceso CP001135), se utilizó como base para el diseño de parejas de oligonucleótidos específicos para los diferentes genes a evaluar. Para cada gen, se seleccionó una pareja de oligonucleótidos que flanqueaban fragmentos génicos internos de entre 260 y 747 pb (Tabla 5.2). La idoneidad de los cebadores se evaluó con el programa Vector NTI 5.10 (Invitrogen, USA) y todos ellos tenían un contenido G+C próximo al 50% para facilitar el posterior empleo de una temperatura de hibridación común a todas las reacciones de PCR, independientemente de qué pareja de oligonucleótidos se emplease.

Para la búsqueda de los genes candidatos anteriormente citados se empleó una colección de cepas de *E. tarda* que incluyó 10 cepas representativas aisladas de rodaballo y 17 cepas de distintos orígenes geográficos y hospedadores (ver Tablas 3.5 y 3.6, Sección 3).

Tabla 5.2.- Factores de virulencia, genes candidatos y cebadores diseñados

FACTOR DE PATOGENICIDAD	GEN	CEBADORES	SECUENCIAS DE LOS CEBADORES	TAMAÑO DEL AMPLIFICADO
Colagenasa	<i>yhbU</i>	colag 1	5'-CATTTCGTCATTGGCATAG-3'	340
		colag 2	5'-CACGTTTCGGTACAGGCATC-3'	
Condroitinasa	<i>cds1</i>	chond1	5'-TCTCCACCCATAATGCCACG-3'	435
		chond2	5'-CAAACGGCGTCGTGTAGTCG-3'	
Invasina	<i>shdA</i>	Inv1	5'-ACCGTGGGCGAACTTACGAA-3'	296
		Inv2	5'-GCACATCGTCGAATAAACCC-3'	
Pilus	<i>papF</i>	papF1 papF2	5'-TTTATAGGGGACAGCAGTGA-3' 5'-GAAGAGCAAACGGTCAATG-3'	286
Sistema de secreción tipo III	<i>eseD</i>	ttss1	5'-ACGCTGCTGGCGATACGTTTC-3'	467
		ttss2	5'-CTGAATGAGCTGATGGTTCA-3'	
Detección de quorum	<i>AI1</i>	Q1-1	5'-ATCCGCAGCATCGAATGGCT-3'	360
		Q1-2	5'-GAAGGATAACGATGTGGTGT-3'	
Detección de quorum	<i>luxS</i>	Q2-1	5'-CTCTGGGATGCTCCGCTGAT-3'	310
		Q2-2	5'-ATCACCGTATTTCGATCTGCG-3'	
Detección de quorum	<i>qseC</i>	Q3-1	5'-CAGCAGTAGCAGGATCACCA-3'	260
		Q3-2	5'-ATGGACGTATGCTGCTCAAC-3'	
Captación de hierro	<i>cds1</i>	pvsA1	5'-CTGGAGCAGTACCTCGACGG-3'	313
		pvsA2	5'-CGATGCTGCGGTAGTTGATC-3'	
Captación de hierro	<i>cds2</i>	pvsB1	5'-GATGTTTCATCACCATCACCC-3'	217
		pvsB2	5'-GCTTTCAGCAGGTATTTCA-3'	
Captación de hierro	<i>cds2</i>	pvsB3	5'-ACACCCACTGGCTATACGCC-3'	710
		pvsB4	5'-AAGATGACAATCGGGGTGCT-3'	
Captación de hierro	<i>cds3</i>	cds3-1	5'-GCTCAATGAAGACTTTCGTC-3'	747
		cds3-2	5'-GTCCGCAGGTTGTTTTGCT-3'	
Captación de hierro	<i>cds6</i>	recept1	5'-AGCGTCATCAGCAACCAGCA-3'	420
		recept2	5'-GCTGCTGATATAGGTGTCGG-3'	

El protocolo de PCR empleado se muestra en la Tabla 5.3, y las reacciones de amplificación se prepararon empleando Ready-To-Go PCR-beads™ (Amersham Pharmacia Biotech, España), las parejas de cebadores citadas anteriormente (Tabla 5.2) y el DNA de los distintos aislados de *E. tarda* extraído según el procedimiento ya descrito en capítulos anteriores (Ver Sección 4, apartado 4.2.5).

Para la visualización de los productos de PCR se utilizaron geles de agarosa horizontales al 1% teñidos con bromuro de etidio (Bio-Rad) a 100 v durante 90 min y un marcador de peso molecular de 50-2000 pb (Sigma, USA).

Tabla 5.3.- Protocolo de amplificación de ADN para la detección de genes implicados en la patogénesis.

FASE	TEMPERATURA (°C)	DURACIÓN (min)	
Desnaturalización inicial	94	5	
Desnaturalización	94	1	35 ciclos
Hibridación	55	1	
Elongación	72	1	
Elongación final	72	5	

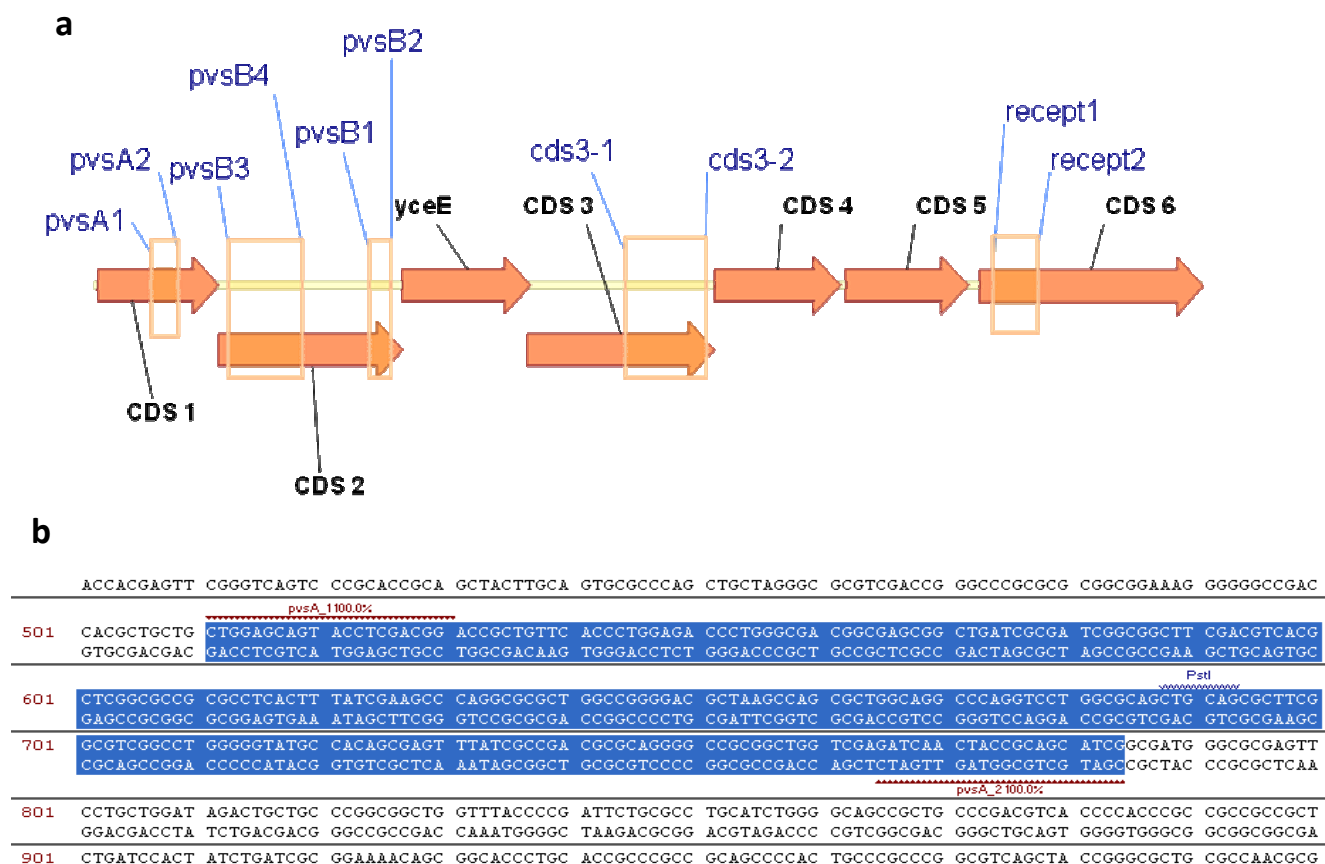


Figura 5.1.- Vista general del diseño de parejas de oligonucleótidos específicos. En este caso se representa a modo de ejemplo, únicamente el diseño de los oligos implicados en la captación de hierro. (a) Mapa del locus; (b) Representación visual de la región amplificada por los cebadores pvsA1 y pvsA2.

Por otra parte, y como complemento al estudio de búsqueda de posibles genes implicados en la virulencia, nos propusimos determinar en un grupo representativo de aislados de *E. tarda*:

a) La correlación genotipo-virulencia.

b) La correlación genotipo-fenotipo para dos factores de virulencia concretos: la actividad condroitinasa y los sistemas de captación de hierro.

a) Correlación genotipo-virulencia:

Con el fin de determinar la correlación genotipo-virulencia y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los experimentos de detección de genes de virulencia, se realizaron nuevos ensayos de inoculación con un grupo de cepas formado por 10 aislados representativos de rodaballo y 17 cepas de distintos orígenes (ver Tabla 5.5). Se emplearon alevines de rodaballo que se inocularon vía i.p. El procedimiento fue el mismo que el descrito en el apartado 5.2.1 (a), manteniendo una temperatura constante en los tanques de 18° C. Las dosis inoculadas fueron desde 2×10^4 a 2×10^6 CFU/gr de pez.

b) Correlación genotipo-fenotipo:

- **Actividad condroitinasa en placa:**

Las placas se prepararon añadiendo Condroitin-Sulfato A (4 mg/ml) (Sigma, España) y seroalbúmina bovina (Sigma, España) al 5% al medio general BHI (agar infusión cerebro corazón; Oxoid, Francia) con unas proporciones finales de 10% y 20% (v/v) respectivamente.

Las cepas se inocularon poniendo acúmulos bacterianos sobre las placas que fueron incubadas a 25° C durante 48 h. El revelado se realizó con ácido acético 2 N. La aparición de un halo translúcido alrededor del acúmulo bacteriano se consideró como un resultado positivo.

- **Producción y tipo de sideróforos:**

La producción de sideróforos se evaluó siguiendo el protocolo descrito por Schwyn y Neilands (1987). Este método utiliza el colorante cromo azurol S (CAS) junto con el detergente bromuro de hexadecil trimetilamonio (HDTMA) para formar un complejo estable que cambia de color en presencia o ausencia de hierro. La detección de sideróforos se realizó en placas de agar CAS. La coloración azulada de este medio, debida al complejo ternario que el CAS-HDTMA forman con el Fe^{+3} , cambia a anaranjada cuando un agente quelante de hierro o un sideróforo le sustrae este catión.

La lectura se efectuó a las 24-48 h detectándose la producción de sideróforos por formación alrededor de las colonias de un halo de color naranja sobre el fondo azul del medio. La relación diámetro del halo naranja/diámetro colonial, como media de dos determinaciones independientes, fue considerada una aproximación cuantitativa de los niveles de sideróforo producidos por las cepas (Amaro y col., 1990).

Ya que la mayoría de los sideróforos conocidos pertenecen al grupo de los catecol-fenolatos o al de los hidroxamatos, para determinar la naturaleza de los sideróforos excretados por los aislados se realizaron ensayos químicos específicos. Para ello, se llevaron a cabo los ensayos colorimétricos de Arnow (1937) (detección de catecoles) y Csáky (1948) (detección de hidroxamatos) empleando sobrenadantes obtenidos por centrifugación (10000 rpm, 10 min, 4º C) y posterior filtración (0.22 μ m) de cultivos bacterianos en medio mínimo M9 en condiciones de restricción de hierro (40 μ M de 2,2' dipiridil).

La cuantificación de los sideróforos se realizó por lectura espectrofotométrica de las mezclas finales a 517.5 nm ($A_{517.5}$) en el ensayo de Arnow y a 530 nm (A_{520}) en el de Csáky utilizándose un espectrofotómetro Spectrometer Lambda 2 (Perkin Elmer, España)

5.3.- RESULTADOS

5.3.1.- Estudios de virulencia en peces:

Los ensayos de patogenicidad mostraron que todas las cepas de *E. tarda* estudiadas, independientemente de su origen geográfico y de la fuente de aislamiento, son capaces de causar mortalidades. Todos los peces muertos y moribundos mostraron una sintomatología similar caracterizada por: lesiones en la piel y pérdida de pigmentación, petequias generalizadas en la musculatura (especialmente en la parte ventral del pez) y tumefacciones en los ojos. Internamente, se observó abundante líquido ascítico en la cavidad abdominal y órganos internos hemorrágicos. Los resultados obtenidos para cada uno de los experimentos de inoculación se muestran en la Tabla 5.4.

a) Inoculación intraperitoneal (i.p.):

En los ensayos de inoculación intraperitoneal a 18° C las 9 cepas ensayadas resultaron ser patógenas con un elevado grado de virulencia, independientemente de la especie de pez empleada como hospedador (rodaballo, lenguado o lubina).

Los aislados procedentes de rodaballo fueron los que mostraron valores de LD₅₀ menores para las tres especies de pez empleadas y, por tanto, los más virulentos. En la figura 5.2 se muestra la cinética de las mortalidades en el ensayo de virulencia en rodaballos de la cepa ACC35.1 (aislada de rodaballo) a 18° C. Las concentraciones más altas inoculadas (10⁴ y 10⁵ CFU/g) provocaron la aparición de las primeras mortalidades tan sólo 3-4 días después de la infección. A medida que se disminuyó la dosis, las primeras mortalidades se retrasaron hasta el día 12 para las menores concentraciones de inóculo.

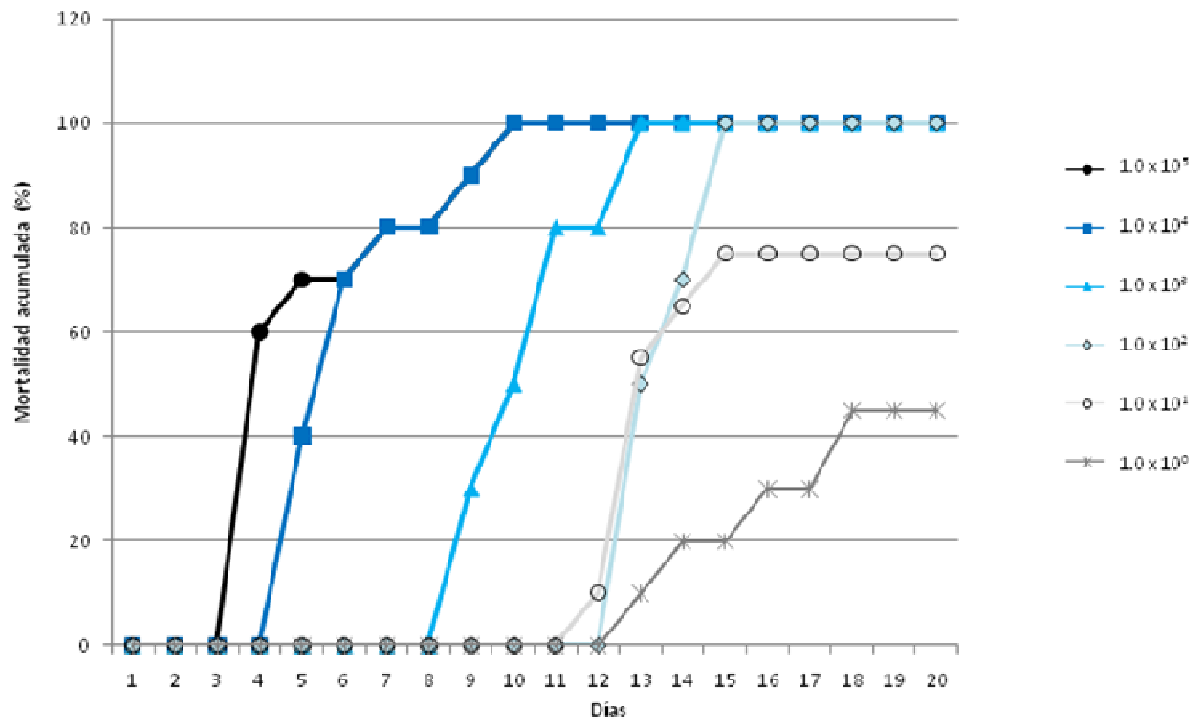


Figura 5.2.- Mortalidad acumulada (%) en los ensayos de inoculación de rodaballos por i.p. a 18° C empleando distintas concentraciones bacterianas (CFU/g) de la cepa ACC35.1. En el control negativo se produjo un 0% de mortalidades.

En los ensayos realizados a 15° C en rodaballo, los resultados obtenidos demostraron que el grado de virulencia de las cepas también es elevado a esta temperatura aunque se aprecia un retraso en el tiempo de aparición de las primeras mortalidades con respecto a lo ocurrido en los ensayos a 18° C. Así, las primeras mortalidades a 15° C se dieron alrededor del día 12, incluso en el caso de las dosis más altas, describiendo una cinética similar a la observada a 18° C cuando se inoculaban dosis más bajas (Figura 5.3).

Tabla 5.4.- Valores de LD₅₀ para los aislados de *E. tarda* empleados en este estudio (CFU/g en los ensayos por i.p y CFU/ml en las inoculaciones por baño).

CEPA	ORIGEN	Rodaballo				Lenguado				Lubina		Ratón
		i.p.		Baño	Cohabitación	i.p.	Baño	i.p.	i.p.	i.p.	i.p.	
		a 18°C	Choque térmico									
ACC35.1	Rodaballo	2.6x10 ⁹ ±0.2	1.4x10 ² ±0.15	1.6x10 ⁴ ±0.17	2.6x10 ² ±0.31	1.6x10 ⁴ ±0.11	2.3x10 ⁴ ±0.1	3.1x10 ⁴ ±0.2	1.7x10 ² ±0.17	<1.6x10 ⁵ ±0.31		
HL1.1	Rodaballo	2.4x10 ⁹ ±0.12	1.7x10 ² ±0.19	1.1x10 ⁴ ±0.11	3.1x10 ³ ±0.19	1.1x10 ⁴ ±0.16	2.2x10 ⁴ ±0.21	3.4x10 ⁴ ±0.18	1.5x10 ² ±0.11	<1.1x10 ⁵ ±0.27		
RM288.1	Rodaballo	2.3x10 ⁹ ±0.21	1.1x10 ³ ±0.12	3.1x10 ⁴ ±0.27	4.1x10 ³ ±0.22	3.1x10 ⁴ ±0.21	2.4x10 ⁴ ±0.14	4.1x10 ⁴ ±0.27	1.3x10 ² ±0.17	<3.1x10 ⁵ ±0.25		
ACC69.1	Rodaballo	2.5x10 ⁹ ±0.15	1.6x10 ³ ±0.17	1.2x10 ⁴ ±0.16	2x10 ³ ±0.24	1.2x10 ⁴ ±0.14	2.7x10 ⁴ ±0.19	2.3x10 ⁴ ±0.24	1.6x10 ³ ±0.2	<1.2x10 ⁵ ±0.29		
KG7901	Tilapia	3.3x10 ² ±0.13	NT*	NT	NT	NT	3.3x10 ² ±0.26	7.3x10 ⁴ ±0.19	NT	<3.3x10 ⁵ ±0.2		
WFE1	Platija	2.7x10 ³ ±0.21	5.7x10 ³ ±0.09	NT	8.7x10 ³ ±0.18	2.4x10 ³ ±0.16	2.7x10 ² ±0.15	1.3x10 ⁴ ±0.23	2.2x10 ³ ±0.16	<1.7x10 ⁵ ±0.28		
E-11-2	Anguila	4.5x10 ³ ±0.1	NT	NT	5.2x10 ³ ±0.16	NT	4.5x10 ³ ±0.28	3.6x10 ⁴ ±0.17	NT	<4.5x10 ⁵ ±0.19		
9.8	Lubina	2.2x10 ⁹ ±0.11	3.3x10 ² ±0.3	3.2x10 ⁴ ±0.16	8.2x10 ³ ±0.16	1.2x10 ² ±0.1	2.8x10 ⁴ ±0.17	4.2x10 ⁴ ±0.15	1.9x10 ² ±0.11	<1.2x10 ⁵ ±0.3		
ET006	Besugo	3.2x10 ⁹ ±0.14	4.2x10 ² ±0.1	5.4x10 ⁴ ±0.16	NT	NT	3.3x10 ² ±0.21	4.4x10 ⁴ ±0.22	NT	<3.2x10 ⁵ ±0.27		

NT: experimento no realizado

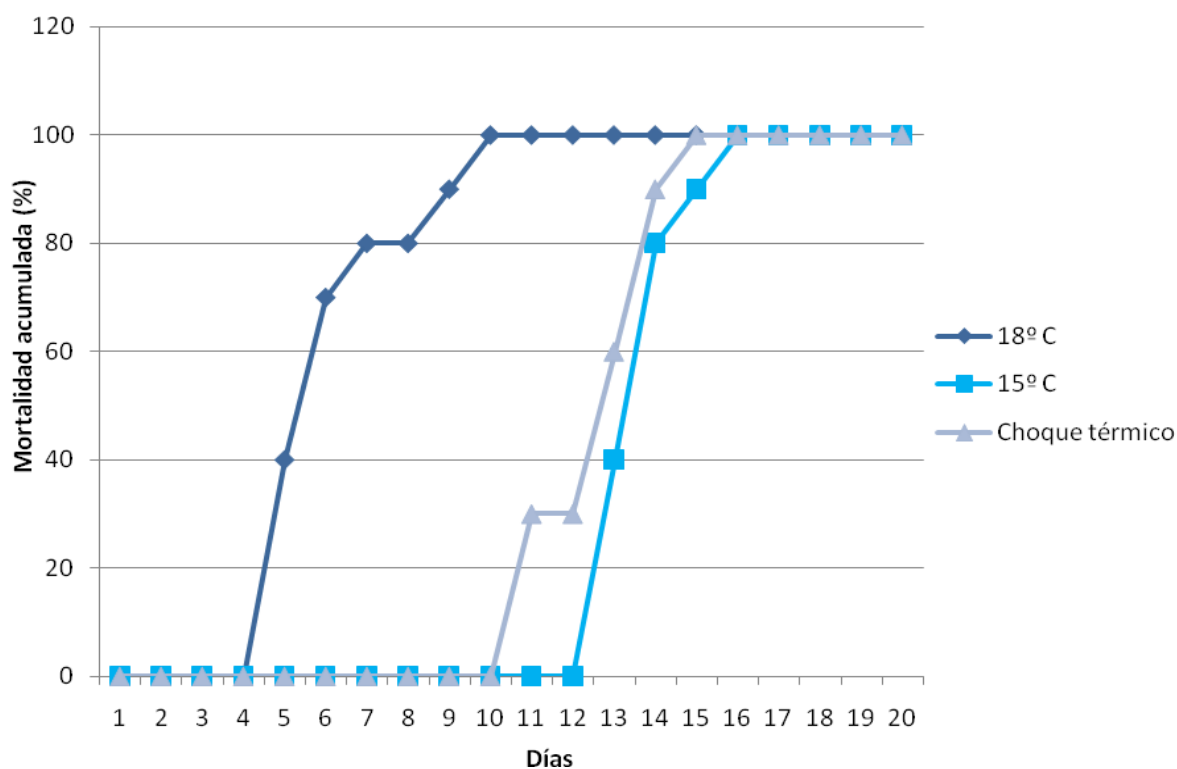


Figura 5.3.- Mortalidad acumulada (%) en los ensayos de inoculación de rodaballos por i.p. a diferentes temperaturas empleando la cepa ACC35.1 a una dosis de 1×10^4 CFU/g. En el control negativo se produjeron un 0% de mortalidades.

En cuanto a los ensayos empleando choque térmico, los resultados obtenidos concordaron con los de los ensayos anteriores. Mientras los peces se mantuvieron a 15° C no se produjeron mortalidades y fue solamente un día después del aumento de temperatura (día 11) cuando se observaron las primeras bajas. Estas mortalidades continuaron en los 4 días siguientes, alcanzando rápidamente el 100% de mortalidades (Figura 5.3).

b) Inoculación por baño:

Los ensayos de inoculación por baño en rodaballo y lenguado mostraron que las cepas ensayadas poseen un elevado grado de virulencia por esta vía, ligeramente inferior al obtenido por i.p. (ver Tabla 5.5). Los valores de LD₅₀ obtenidos para las distintas cepas fueron de 10³ CFU/ml para los ensayos en rodaballo y de 10⁴ CFU/ml para el lenguado. Comparando la cinética de las mortalidades entre baño e i.p., se comprobó que, tal como podíamos esperar, para una misma dosis las mortalidades comenzaban más tarde en el caso de la inoculación por baño. Así, para una dosis de 10⁴ cel/ml las primeras mortalidades no se daban hasta el día 8 (Figura 5.4).

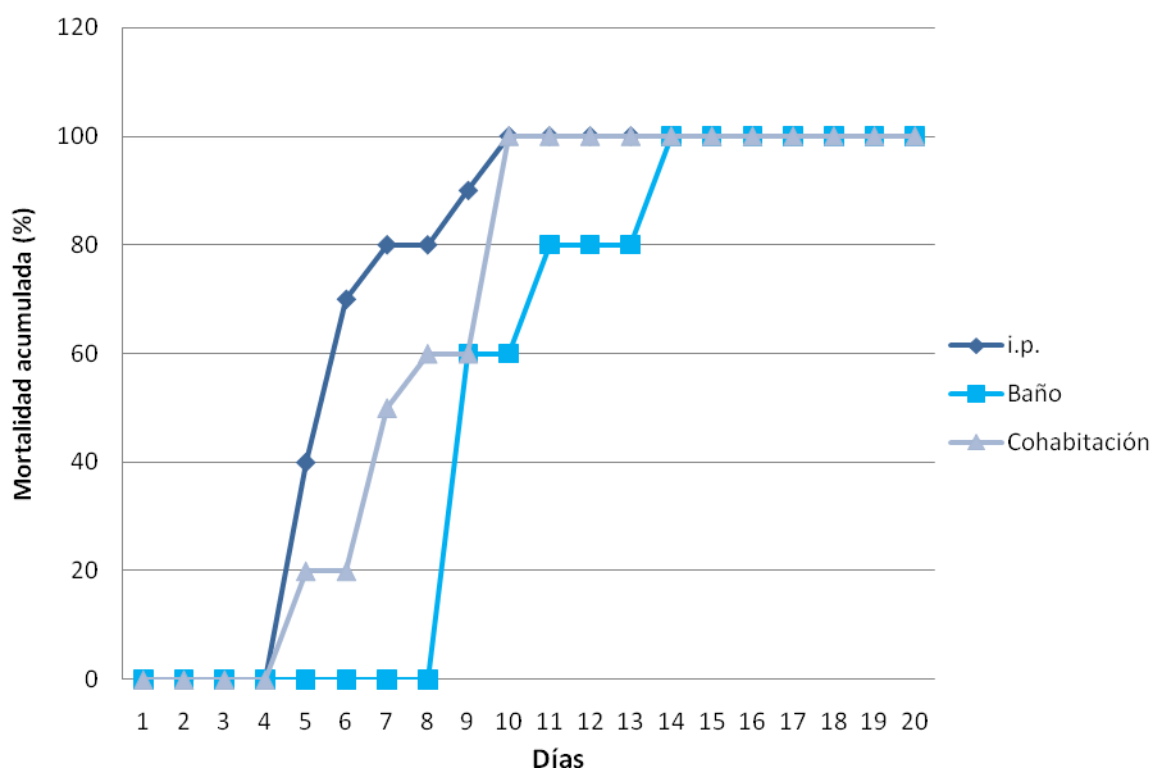


Figura 5.4.- Mortalidad acumulada (%) en los ensayos de inoculación de rodaballos empleando diferentes rutas de infección y la cepa ACC35.1 a una dosis de 1×10^4 CFU/g o CFU/ml (para los experimentos de i.p./cohabitación o baño respectivamente). En el control negativo se produjeron un 0% de mortalidades.

c) Inoculación por cohabitación:

En los ensayos de cohabitación se comprobó que la bacteria posee una gran capacidad de replicación en el interior del pez y que, al ser expulsada al exterior, es capaz de infectar y causar mortalidades en otros peces no inoculados. Así, para una dosis de 10^4 cel/ml los peces inoculados comenzaron a morir a partir del día 4 (al igual que ocurría en los ensayos de inoculación por i.p. a 18°C), y en los peces no inoculados las mortalidades ocurrían solamente 2 días después, alcanzando el 100% de mortalidad alrededor del día 10, incluso antes que en los ensayos de inoculación por baño para esa misma dosis (Figura 5.4).

5.3.2.- Estudios de virulencia en animales homeotermos:

Cuando los ensayos se realizaron empleando ratones, se observaron resultados del 100% de mortalidad para dosis de 10^6 cel/ml en todas las cepas de *E. tarda* estudiadas, produciéndose las primeras mortalidades en algunas de las cepas incluso antes que en el caso de la cepa CDC 2227-81 de *Ph. damsela* subsp. *damsela* empleada como control positivo (Tabla 5.4).

5.3.3.- Detección de genes implicados en la virulencia:

Los resultados obtenidos en este ensayo se muestran en la Tabla 5.5. Todos los aislados de rodaballo mostraron idénticos resultados para la presencia o ausencia de los genes muestreados. En cuanto a las cepas procedentes de otros orígenes, solamente las cepas 81.48, procedente de pez gato, FL3-22 aislada de pez ángel y las dos cepas de referencia NCIMB2034 (especie de pez sin determinar) y CECT849 (humanos), mostraron un patrón claramente distinto, caracterizado por el resultado negativo en muchas de las reacciones de amplificación realizadas.

Tabla 5.5.- Resultados obtenidos en las reacciones de amplificación de los genes candidatos a codificar factores de virulencia y en los estudios de correlación genotipo-virulencia.

CEPA	HOSPEDADOR	VIRULENCIA (CFU/g)	Genes candidatos												
			collag	chond	Inv	papF	TTSS	Q1	Q2	Q3	pvsA	pvsB1	pvsB3	cds3	recept
Aislados de rodaballo (10)	Rodaballo	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
81.48	Pez Gato	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
KGE 7901	Tilapia	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
07BS	Tilapia	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
205/03	Dorada	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
FL3-22	Pez ángel	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
EDK 1	Anguila	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
E-11-2	Anguila	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
9.8	Lubina americana	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
FL4-53-4K	Lubina americana	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
WFE 1	Platija	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
WFE 10	Platija	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
ET 001	Besugo	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
ET 006	Besugo	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
ET 009	Besugo	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
FP 176-99	Salmon del Pacífico	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
NCIMB2034	Especie de pez desconocida	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
CECT849	Heces de humanos	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-

+: LD₅₀ < 2x10⁴

-: LD₅₀ > 2x10⁵

a) Correlación genotipo-virulencia:

Los resultados de virulencia, demostraron que todas las cepas de *E. tarda* que mostraron resultados positivos de amplificación para la mayoría de los genes muestreados fueron virulentas para rodaballo. Solamente las cepas: 81.48, FL3-22; NCIMB2034 y CET849 no causaron mortalidades en los peces con ninguna de las dosis inoculadas, por lo que el valor de LD₅₀ para estas 4 cepas sería mayor a 2×10^6 CFU/g, lo que indicaría que son poco o nada virulentas y que podría existir una cierta correlación entre virulencia y la presencia de aquellos genes para los que se obtuvieron amplificaciones negativas (Tablas 5.5 y 5.6).

b) Correlación genotipo-fenotipo:

- **Actividad condroitinasa en placa:**

Los resultados obtenidos en este ensayo se muestran en la tabla 5.6. Los mayores halos los produjeron las cepas aisladas de rodaballo, con diámetros comprendidos entre 28 y 36 mm. Valores similares, aunque ligeramente menores, se obtuvieron también para cepas aisladas de otros hospedadores. Resultó especialmente interesante el hecho de que las cepas que produjeron resultado negativo para el gen de la condroitinasa, produjeron también halos de degradación a su alrededor (de entre 8 y 16 mm), si bien, éstos resultaron menores que los del resto de las cepas. La única cepa que no produjo halo de degradación fue el aislado de humanos CECT849.

Tabla 5.6.- Resultados obtenidos para las pruebas de virulencia, actividad condroitinasa en placa, producción de sideróforos en placas de CAS y ensayos de Arnow y Csáky.

CEPA	HOSPEDADOR	VIRULENCIA	ACTIVIDAD CONDRITINASA (mm)	PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS EN PLACAS DE CAS ^b	Ensayo de Arnow (A _{217.5})	Ensayo de Csáky (A ₅₂₀)
Aislados de rodaballo (10)	Rodaballo	+	28-36 ^a	++	-	0.378-0.461
81.48	Pez Gato	-	16	+	-	0.305
KGE 7901	Tilapia	+	22	++	-	0.403
07BS	Tilapia	+	18	+	-	0.385
205/03	Dorada	+	19	+	-	0.346
FL3-22	Pez ángel	-	13	+	-	0.311
EDK 1	Anguila	+	24	++	-	0.401
E-11-2	Anguila	+	24	++	-	0.421
9.8	Lubina americana	+	25	++	-	0.399
FL4-53-4K	Lubina americana	+	23	+	-	0.341
WFE 1	Platija	+	22	++	-	0.446
WFE 10	Platija	+	21	++	-	0.411
ET 001	Besugo	+	20	++	-	0.398
ET 006	Besugo	+	24	++	-	0.400
ET 009	Besugo	+	23	++	-	0.387
FP 176-99	Salmon del Pacifico	+	22	+	-	0.361
NCIMB2034	Especie de pez desconocida	-	15	++	-	0.318
CECT849	Heces de humanos	-	0	++	-	0.326

^aValores máximo y mínimo observados en los aislados de rodaballo^bRelación diámetro del halo naranja/diámetro de la colonia: +, 1.3 a 2.0; ++, 2.0 a 3.0.

- **Producción y tipo de sideróforos:**

Todas las cepas de *E. tarda* empleadas resultaron positivas para la producción de sideróforos en placas de CAS, al producir el cambio de coloración del medio azul a anaranjado. Este viraje alrededor de las colonias se observa cuando las cepas liberan al medio compuestos con “alta afinidad” por el ión Fe^{+3} que provocan la disociación del complejo CAS-HDTMA (Schwyn & Neilands, 1987).

Las cepas fueron consideradas productoras de sideróforos a niveles bajos o intermedios siguiendo el criterio de Amaro y col. (1990) (relación halo naranja/ diámetro de la colonia ≤ 3.0) (Tabla 5.6 y Figura 5.5).

En cuanto al tipo de sideróforos producido, todas las cepas dieron resultado negativo en el ensayo colorimétrico de Arnow y positivo en el de Csáky. En base a estos resultados podemos decir que las cepas de *E. tarda* producen sideróforos de tipo hidroxamato.

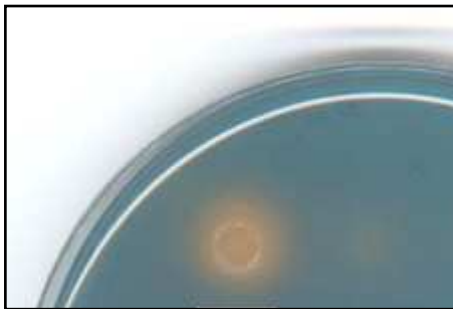


Figura 5.5.- Ejemplo representativo de una cepa de *E. tarda* positiva para la producción de sideróforos en una placa de CAS.

5.4.- DISCUSIÓN

A pesar de que en un primer momento *E. tarda* fue descrita como causante de edwardsielosis en peces típicos de aguas templadas, los resultados obtenidos en los estudios de virulencia realizados en este trabajo han demostrado que la temperatura influye en la celeridad con la cual la bacteria es capaz de causar mortalidades, pero no en su potencial patógeno. Así, incluso a bajas concentraciones de bacteria inoculadas, se observaron mortalidades a 15° C de temperatura. Estos resultados, estarían de acuerdo con las recientes descripciones de epizootias producidas por *E. tarda* en el Norte y Sur de Europa en épocas de bajas temperaturas del agua (Castro y col., 2006). Zheng y col. (2004) realizaron ensayos con platija en Japón y demostraron también que la virulencia de las cepas de *E. tarda* aumentaba cuando los peces se mantenían a mayor temperatura.

Al igual que sucede con muchos de los patógenos bacterianos de peces estudiados (Baya y col., 1997), los resultados obtenidos en los ensayos de inoculación por baño para *E. tarda* mostraron valores de LD₅₀ ligeramente mayores que los obtenidos en los experimentos vía i.p. Los resultados obtenidos en los ensayos de cohabitación demuestran que *E. tarda* tiene la capacidad de reproducirse rápidamente en el interior de los peces infectados y, además, es capaz de sobrevivir en el agua de cultivo tras ser expulsada al exterior manteniendo su capacidad de infectar a otros peces. Así, la transmisión horizontal de *E. tarda* podría jugar un importante papel en el desarrollo y transmisión de la edwardsielosis en la industria de la acuicultura.

Por otra parte, las cepas de rodaballo incluidas en este estudio y procedentes de diversos orígenes geográficos y de hospedador, han sido capaces de inducir mortalidades en las tres especies ensayadas por diferentes vías, por lo que parece demostrarse que no existe especificidad de huésped para estos aislados. Xiao y col (2009) emplearon cepas aisladas de rodaballo en China para infectar ejemplares del pez espada (o cola de espada, *Xiphophorus helleri*), de uso común en acuarios de agua dulce. Sus resultados mostraron que estas cepas de origen marino eran capaces de causar mortalidades incluso en peces de agua dulce con bajas concentraciones bacterianas. Sin embargo, también existen algunos estudios que han descrito la baja o nula virulencia de determinadas cepas cuando eran inoculadas en otras especies diferentes a la de su hospedador (Matsuyama y col., 2005).

En resumen, en este primer apartado, hemos demostrado el alto potencial patógeno de las cepas de *E. tarda* aisladas de rodaballo. Por lo tanto, además del peligro actual que esta especie representa para los cultivos de rodaballo, en base a los resultados de nuestros ensayos, podemos afirmar que podría llegar también a representar un importante factor de riesgo para otros cultivos, especialmente en aquellas instalaciones donde se cultiva más de una especie simultáneamente. De hecho, en los últimos meses de realización de este trabajo se han descrito infecciones causadas por *E. tarda* en lenguado cultivado en plantas donde anteriormente habían existido poblaciones de rodaballo afectadas por esta enfermedad (ver Anexo 4).

Van Damme y Vandepitte (1980) demostraron que algunas especies de peces tropicales eran frecuentes portadores de *E. tarda*, considerando que podrían representar un reservorio natural a partir del cual la bacteria podía ser transmitida al hombre a través de su consumo. Posteriormente, Vandepitte y col. (1983) publicaron un estudio en donde relacionaban, mediante diversas técnicas de tipado, cepas de *E. tarda* aisladas a partir de peces de acuario con otras causantes de un caso de diarrea en un bebé y valoraban el posible potencial enteropatógeno de esta bacteria. Nuestros resultados demuestran que las 7 cepas de *E. tarda* empleadas en este estudio son virulentas para animales homeotermos. De acuerdo con esto, concluimos la necesidad de extremar las precauciones en las plantas de acuicultura cuando se manipulan o procesan peces que pudieran estar infectados con el fin de evitar posibles transmisiones del patógeno y la aparición de zoonosis.

En los estudios de detección de genes implicados en la virulencia, los resultados obtenidos variaron entre las distintas cepas empleadas. Todos los aislados de rodaballo presentaron un perfil idéntico de amplificaciones positivas/negativas para los distintos genes muestreados. Fue en el resto de las cepas procedentes de otros orígenes donde se encontraron las mayores diferencias. En todos los casos, un resultado de amplificación positivo indicó la presencia del gen para esa cepa en cuestión y que la secuencia correspondiente al gen amplificado era idéntica a la depositada en la base de datos. Sin embargo, cuando el resultado obtenido fue negativo no implicó necesariamente la ausencia de dicho gen. Con los ensayos realizados, solamente podemos afirmar que, como mínimo, la secuencia de estos genes en las cepas estudiadas diferiría de la secuencia de los mismos en la cepa depositada en las bases de datos.

La invasión del hospedador por parte de un patógeno bacteriano puede verse favorecida por la producción de determinados compuestos bacterianos extracelulares como colagenasas o condroitinasas. La actividad colagenasa puede ser responsable de algunos de los síntomas externos comunes en infecciones bacterianas ya que ayuda a la degradación de tejidos del pez. Por otra parte, se sabe que la actividad condroitinasa contribuye a la virulencia de especies del género *Edwardsiella* (Waltman y col., 1986) y media en la degradación tisular producida en la lesión crónica conocida como “agujero en la cabeza” (Shotts & Cooper, 1992). Otros factores de virulencia de importancia en el proceso patogénico pueden ser las adhesinas o invasinas, proteínas que facilitan la adhesión e invasión celular. En nuestros estudios de detección de genes implicados en la virulencia, hemos encontrado que todos los aislados de rodaballo mostraron amplificación positiva de los genes que codifican para la colagenasa, condroitinasa e invasina. Las cepas 81.48, FL3-22, CECT849 y NCIMB2034 mostraron resultados negativos para estos tres genes, mientras que las cepas ET001, ET009 y 205/03 solamente dieron resultado negativo para la amplificación de la invasina. Sin embargo, en los ensayos de correlación genotipo-fenotipo únicamente la cepa CECT849 no produjo el halo de degradación correspondiente a la presencia de condroitinasa por lo que sería posible que las otras tres cepas (NCIMB2034, 81.48 y FL3-22) produjesen algún otro tipo de condroitinasa diferente.

El sistema de secreción tipo III (TTSS) es un sistema de transporte de proteínas bacterianas, denominadas efectores, al citoplasma de células del hospedador. Tan y col. (2005) y Zheng y col. (2005) demostraron que el TTSS está involucrado en la virulencia de *E. tarda*, siendo la proteína EseD una de las principales proteínas secretadas. En un reciente trabajo, Wang B. y col. (2010) demostraron que esta proteína juega un papel específico en la patogénesis de este patógeno bacteriano, y que podría ser un antígeno candidato para el desarrollo de futuras vacunas. Nuestros resultados muestran que la gran mayoría de las cepas ensayadas muestran amplificación positiva para este gen, con la única excepción de las cepas 81.48, CECT849 y NCIMB2034.

Otro factor de virulencia ampliamente descrito en bacterias Gram negativas es el denominado “quorum sensing”, o detección de quorum. La señal que cada bacteria emplea para esta “comunicación” se denomina sistema autoinductor (AI) y se conocen varios tipos. El AI1 se ha identificado como una AHL y está implicado en la comunicación entre individuos de una misma especie. El sistema AI2 se relaciona con la comunicación entre especies y las moléculas son de tipo

furanosil borato. El sistema AI3 ha sido descrito recientemente en cepas enterohemorrágicas de *E. coli* y su síntesis depende del gen *luxS*. En este apartado empleamos tres parejas de cebadores, diseñadas cada una en base a la secuencia de genes que codifican para cada uno de estos tres autoinductores. Aunque los resultados fueron variables, en general parecen indicar que el AI1 se encuentra en todas las cepas de *E. tarda*. Por el contrario, observamos resultados negativos para AI2 y AI3 en varias de las cepas estudiadas. Estos resultados concuerdan con los previamente publicados por Morohoshi y col. (2004); Zhang y col. (2008) y Han y col. (2010) quienes describían la detección de moléculas señal de quorum del tipo AHL y actividad AI2 en *E. tarda*. De hecho, estudios recientes en nuestro laboratorio empleando el aislado de rodaballo ACC35.1 han demostrado que éste produce grandes cantidades de AHL in vitro (datos no mostrados).

También se evaluó la presencia de genes implicados en los sistemas de captación de hierro mediados por sideróforos. La capacidad de un patógeno de adquirir hierro en el interior del hospedador es un factor esencial en la patogénesis de muchas bacterias. Por ello, la mayoría de las bacterias han desarrollado sistemas de captación de hierro mediados por moléculas que pueden quelatar y transferir al interior celular el hierro (sideróforos). Basándonos en las secuencias depositadas por Wang Q. y col. (2009), diseñamos cinco parejas de cebadores: cuatro de ellas basadas en la secuencia de genes de síntesis de sideróforos y una en la de un gen que codifica el receptor de membrana externa para el complejo hierro-sideróforo. Los resultados obtenidos mostraron que ninguna de las cepas producía amplificación positiva para dos de los genes de biosíntesis. Sin embargo, todas ellas mostraron amplificación para la pareja de cebadores *pvsB1* y *pvsB2*, que también estaban diseñados sobre la secuencia de un gen de síntesis. En cuanto a las parejas del gen *pvsA* y del receptor, solamente 4 y 3 cepas respectivamente produjeron resultado negativo. A pesar de estos resultados, cuando se llevaron a cabo los ensayos genotipo-fenotipo empleando el medio CAS y los test de Arnow y Csáky, pudimos comprobar que todas las cepas producían sideróforos de tipo hidroxamato, lo que concuerda con otras publicaciones anteriores de *E. tarda* (Kokubo y col., 1990; Igarashi y col., 2002b). Por tanto, y aunque la secuencia de la cepa EIB202 de *E. tarda* depositada por Wang Q. y col. (2009) parece tener homología con el cluster de genes de biosíntesis y transporte de la vibrioferrina sintetizada por *Vibrio parahaemolyticus*, nuestros resultados parecen indicar que podría existir más de un tipo de sideróforos en la especie y que, en cualquier caso, existiría algún tipo de diferencia en los genes implicados en la síntesis y recepción de sideróforos en *E. tarda*. Esta situación no es infrecuente en patógenos de peces, ya que por ejemplo,

Vibrio anguillarum puede producir al menos dos sideróforos diferentes, existiendo cepas que producen o bien vancrobactina (Balado y col., 2006) o bien anguibactina (Actis y col., 1986), siendo completamente diferentes las secuencias de los genes biosintéticos y de transporte. Incluso dentro de un mismo serotipo de *V. anguillarum* se han descrito cepas que producen uno de estos dos sideróforos (Naka y col., 2008).

Por último, los ensayos de correlación genotipo-virulencia demostraron que las cepas que resultaron ser negativas para la amplificación de varios de los genes muestreados, tienen muy disminuida su virulencia, con valores de LD₅₀ mayores a 2×10^6 CFU/g de pez. Esto podría indicar que la patogenicidad de *E. tarda* podría depender muy estrechamente de alguno de estos genes, especialmente de aquellos implicados en la producción de enzimas de degradación de tejidos (colagenasa y condroitinasa) e invasinas.

Pathogenic Potential of *Edwardsiella tarda* Strains Isolated from Turbot

Nuria Castro*, Beatriz Magariños, Soledad Núñez, Juan Luis Barja and Alicia E. Toranzo

Microbiology and Parasitology Department, Faculty of Biology-CIBUS and Aquaculture Institute, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, 15782 Spain

(Received November 3, 2010)

ABSTRACT—In this study, pathogenicity of *Edwardsiella tarda* isolates from turbot *Scophthalmus maximus* as well as other strains from different hosts were tested against turbot, sole *Solea senegalensis* and sea bass *Dicentrarchus labrax*. In addition, the influence of challenge route and temperature in the pathogenic potential of *E. tarda* strains from turbot were also examined. The results obtained showed that *E. tarda* did not have host specificity in virulence and that the turbot isolates were highly virulent regardless of the inoculation route and temperature. Moreover, inoculation experiments performed in mice suggest that these isolates are virulent for mammals. All these findings suggest that this emergent turbot pathogen constitutes an important risk factor for the marine aquaculture.

Key words: *Edwardsiella tarda*, *Scophthalmus maximus*, turbot, virulence

In the last years, repeated outbreaks of edwardsiellosis in cultured turbot *Scophthalmus maximus*, caused by *Edwardsiella tarda*, have occurred in different geographical areas of Europe being a serious problem in the culturing of this fish species^{1,2}. Moreover, this fish pathogen produced high mortalities in other cultured fish species worldwide³.

Numerous studies report that *E. tarda* constitutes a biochemically homogeneous taxon with typical characteristics of an enteric bacterium^{4,5}. With regard to the serological and genetic characteristics, the existence of antigenic^{1,6} and genetic⁷ heterogeneity has been described. However, recent studies in our laboratory indicated that all the *E. tarda* strains isolated from turbot constitute a serological homogeneous group¹ different

from other *E. tarda* strains.

The route of infection of edwardsiellosis is still undefined. The marine environment can constitute an important reservoir of *E. tarda*, since it has been demonstrated that this pathogen remains in seawater and sediment in a dormant state^{8–10} maintaining its pathogenic potential for fish. In addition, there is some evidence that *E. tarda* occurs in water within the vicinity of fish farms⁴ and recently it was reported that cultured sole coexisting in a same rearing facility with turbot cultures, was infected by *E. tarda*¹¹.

Studies on pathogenicity of *E. tarda* employing different conditions or inoculation routes are mostly focused on fish species cultured in Asia as Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, yellowtail *Seriola quinqueradiata*, red sea bream *Pagrus major* or Japanese eel *Anguilla japonica*^{12,13}. However, the determination of the pathogenic capacity and host specificity of *E. tarda* turbot strains could be of great importance for an integrated view of the edwardsiellosis in marine aquaculture. With this aim, challenge experiments in various economically important fish species (turbot, Senegalese sole *Solea senegalensis* and sea bass *Dicentrarchus labrax*) using different routes of infection and temperatures were performed. Moreover, the virulence of all these *E. tarda* strains for mammals was also examined employing a mouse assay model.

Materials and Methods

Bacterial strains

Nine strains of *E. tarda* isolated from fish with different origin and year of isolation were used in this study (Table 1). Their identification was confirmed by biochemical procedures¹ as well as specific PCR¹⁴. Four of them are representative isolates of outbreaks occurred in different turbot farms in Europe between 2004 and 2006¹. *E. tarda* isolates from eel, tilapia, striped bass, flounder and red sea bream obtained from particular donors were also employed as comparison. Experimental cultures were prepared on Trypticase soy Agar supplemented with 1% of NaCl (TSA-1, Difco Laboratories) from stock cultures stored frozen at –80°C in Cryo-Billes (AES Laboratory).

In all the challenges, bacterial suspensions in sterile saline solution (NaCl at 0.85%) (SS) at an initial concentration adjusted by visual comparison to 1.2×10^9 CFU/mL (corresponding to tube No 4 of McFarland turbidity standards) were prepared. To the confirmation of the bacterial concentration, 10-fold dilutions of these suspensions were spread onto TSA-1 plates, incubated at 25°C, and colonies present in each plate were counted. The real concentrations employed in the challenges were expressed as CFU (colony forming units) / mL.

* Corresponding author
E-mail: nuria.castro@usc.es

Fish Challenge Experiments

Turbot coming from a marine farm and sole and sea bass from experimental facilities were selected as representative of economically important cultures of marine fish species. Prior of any inoculation, fish (10 g average weight) were analyzed by classical procedures¹⁵⁾ to determinate if they were free of any bacterial pathogen that could interfere in the results of the experimental infections. Moreover, fish were acclimated to the experimental conditions for 7 days between their arrival to the laboratory and the start of the inoculations. Three types of routes of infection were assayed: intraperitoneal injection (i.p.), bath challenge and cohabitation challenge. In all the fish challenges, faeces were siphoned off and fish behavior was observed daily. Moreover, dead fish were removed and mortalities were recorded daily over a 20 days period after the first dead and the degree of virulence (50% lethal dose; LD₅₀) was calculated by the method of Reed and Muench¹⁶⁾.

Intraperitoneal challenges were performed with turbot, sole and sea bass. According to the procedures of Toranzo *et al.*¹⁷⁾ three replicas of ten fish groups of each fish species were intraperitoneally inoculated with 0.1 mL of 10-fold dilutions ranging from 10¹ to 10⁶ CFU/mL (doses of 10⁰ to 10⁵ CFU/g of fish) of each *E.*

tarda strains tested. Control fish were inoculated with sterile SS. Inoculated and control fish were distributed in 5-liter aquaria with continuous aeration and maintained at 18°C with a heater.

Moreover, two additional experiments by i.p., employing the same procedures as describe above, were performed in order to evaluate the influence of temperature on the degree of virulence of the isolates and/or the kinetic of fish mortalities. These assays were conducted only in turbot and consisted in an assay at 15°C and other in which fish were subjected to a rapid water temperature increase. This heat shock experiment was conducted putting a heater in the aquarium 10 days after the fish inoculation, causing a raise of the water temperature from 15°C to 18°C. The dose employed in this assay was 1 × 10⁴ CFU/g of fish. In addition, a control group consisted of inoculated fish with SS subjected to the same temperature increase, was employed.

In bath challenge, bacterial dilutions were prepared as mentioned above. Three replicas of ten fish groups (turbot and sole) were transferred to 5-liter aquaria, and exposed for 60 min at 18°C to different dilutions of each *E. tarda* strain with final concentrations ranging from 10⁵ to 10² CFU/mL. Control fish were also subjected to the same operations with only SS added to the tanks. Each group of fish (infected and controls) were returned to their original tanks and maintained at 18°C with a heater.

In cohabitation experiments performed in turbot, the capability of *E. tarda* strains to multiply in the fish and infect others was evaluated. Three replica of 20 turbot per tank were employed for each strain. The 50% of each group (ten turbot) were inoculated via i.p. with a dose of 1 × 10³ CFU/g of fish as described above and put into a 20-liter aquarium together with a 50% of not inoculated fish. Each aquarium was continuously aerated with an airstone and maintained at 18°C with a heater. Control groups were manipulated as described

Table 1. *E. tarda* strains used in this study

Strain	Host	Origin	Year
ACC35.1	Turbot	South Europe	2005
HL1.1	Turbot	North Europe	2005
RM288.1	Turbot	South Europe	2006
ACC69.1	Turbot	South Europe	2006
KGE7901	Tilapia	Japan	ND*
E-11-2	Eel	Japan	ND
9.8	Striped bass	USA	ND
WFE1	Flounder	Japan	2002
ET006	Red Sea Bream	Japan	2002

* no data

Table 2. LD₅₀ values for *E. tarda* strains employed in this study

Strain	Turbot			Sole		Sea bass	Mouse		
	i.p.		Bath	Cohabitation	i.p.	Bath	i.p.	i.p.	
	at 18°C	at 15°C							Heat Shock
ACC35.1	2.6±0.2×10 ⁰	1.4±0.2×10 ²	1.6±0.2×10 ¹	2.6±0.3×10 ³	1.6±0.1×10 ¹	2.3±0.1×10 ¹	3.1±0.2×10 ⁴	1.7±0.2×10 ²	<1.6±0.3×10 ⁶
HL1.1	2.4±0.1×10 ⁰	1.7±0.2×10 ²	1.1±0.1×10 ¹	3.1±0.2×10 ³	1.1±0.2×10 ¹	2.2±0.2×10 ¹	3.4±0.2×10 ⁴	1.5±0.1×10 ²	<1.1±0.3×10 ⁶
RM288.1	2.3±0.2×10 ⁰	1.1±0.1×10 ²	3.1±0.3×10 ¹	4.1±0.2×10 ³	3.1±0.2×10 ¹	2.4±0.1×10 ¹	4.1±0.3×10 ⁴	1.3±0.2×10 ²	<3.1±0.3×10 ⁶
ACC69.1	2.5±0.2×10 ⁰	1.6±0.2×10 ²	1.2±0.2×10 ¹	2.0±0.2×10 ³	1.2±0.1×10 ¹	2.7±0.2×10 ¹	2.3±0.2×10 ⁴	1.6±0.2×10 ²	<1.2±0.3×10 ⁶
KGE7901	3.3±0.1×10 ²	NT*	NT	NT	NT	3.3±0.3×10 ²	7.3±0.2×10 ⁴	NT	<3.3±0.2×10 ⁶
E-11-2	4.5±0.1×10 ³	NT	NT	5.2±0.2×10 ³	NT	4.5±0.3×10 ³	3.6±0.2×10 ⁴	NT	<4.5±0.2×10 ⁶
9.8	2.2±0.1×10 ⁰	3.3±0.3×10 ²	3.2±0.2×10 ¹	8.2±0.2×10 ³	1.2±0.1×10 ²	2.8±0.2×10 ¹	4.2±0.2×10 ⁴	1.9±0.1×10 ²	<1.2±0.3×10 ⁶
WFE1	2.7±0.2×10 ²	5.7±0.1×10 ²	NT	8.7±0.2×10 ³	2.4±0.2×10 ²	2.7±0.2×10 ²	1.3±0.2×10 ⁴	2.2±0.2×10 ³	<1.7±0.3×10 ⁶
ET006	3.2±0.1×10 ⁰	4.2±0.1×10 ²	5.4±0.2×10 ¹	NT	NT	3.3±0.2×10 ²	4.4±0.2×10 ⁴	NT	<3.2±0.3×10 ⁶

Figures are expressed as CFU/g of fish or mouse in the i.p. and cohabitation challenges, and CFU/mL in the bath challenges.

* no test

above, but employing SS instead of the bacterial suspension.

Virulence for mice

BALB/c mice of 10 to 12 weeks old and 21 to 25 g were inoculated with doses of 10^6 to 10^8 CFU/ mouse of each *E. tarda* strain (five mice were employed by dose). In this assay, the *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* RM71 strain, with a LD_{50} of 3×10^6 CFU/ mouse, was included as positive control¹⁶. Negative control animals were inoculated with SS. The LD_{50} was calculated by the method described by Reed and Muench¹⁶.

Re-isolation of pathogen

Re-isolation of the pathogen from the kidney, liver and spleen of dead and moribund fish and kidney from mice was carried out in order to confirm the bacterial infection. In all cases, these internal organs were streaked on TSA-1 plates that were incubated at 25°C for 24 h. The strains isolated were subjected to taxonomical analysis by standard biochemical plate and tube test^{19,20} and using the commercial API 20E system (Biomereux). In addition, slide agglutination was performed to confirm their identification as *E. tarda*.

Results and Discussion

The pathogenicity assays showed that *E. tarda* isolates employed in this work, regardless of their geographic origin and source of isolation, were able to cause mortality in all the fish species (Tables 1 and 2), demonstrating that *E. tarda* could represent a potential risk for these cultures. All dead and moribund fish showed cutaneous lesions as lack of pigmentation, small hemorrhages in the musculature and in the visceral region, and some of them presented tumefactions around the eyes. Internally, abundant ascitic fluid in

the abdominal cavity and hemorrhagic kidney was observed. These diseased signs are coincident with those described in natural infections of edwardsiellosis in fish^{1,2}. *E. tarda* was recovered in pure culture from all the internal organs of all dead and moribund fish.

In the i.p. challenges performed at 18°C, all turbot isolates presented the highest degree of virulence with LD_{50} values between 10^0 – 10^2 CFU/g, depending of the fish host (Table 2). In the i.p. assay performed at 18°C in turbot for the representative isolate ACC35.1, most of the doses tested (10^2 to 10^5 CFU/g of fish) caused a rapid evolution of mortalities reaching the 100% in a relative short time period (within 15 days post-inoculation) (data not shown).

Although edwardsiellosis caused by *E. tarda* is classically associated to warm-water temperature⁵, our results obtained in the i.p. assays performed in turbot at 15°C (Table 2) confirmed the significant pathogenic potential of this bacterium even at this low temperature. However, as expected, temperature exerted influence in both the LD_{50} values and the evolution of mortalities (Table 2, Fig. 1). In fact, in this challenge, mortalities began 12 days after inoculation, even with the highest concentrations of inocula (10^3 to 10^4 CFU/g) and then, deads increased rapidly reaching the 100% in 3 or 4 days (at day 16 post-infection) (Fig. 1).

The results described in the i.p. assays at 15°C and 18°C are in agreement with those obtained in the temperature increase experiment. In fact, in this assay, mortalities began by day 11 (only 1 day after the heat stress) and continues for 4 days reaching 100% of mortalities (Fig. 1). These results confirm that temperature is closely related with the celerity of the mortalities caused by *E. tarda*. Similar findings were reported by Zheng *et al.*²¹ who demonstrated that in Japanese flounder the virulence of *E. tarda* strains increased when the fish were reared at high temperature.

The prolonged immersion experiments showed that

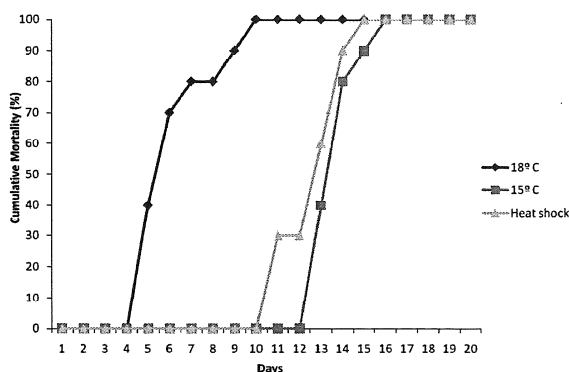


Fig. 1. Cumulative mortality (%) in the turbot inoculation experiments by i.p. at different temperatures employing the ACC35.1 strain at a dose of 1×10^4 CFU/g. Negative control groups showed 0% mortality during the experiment.

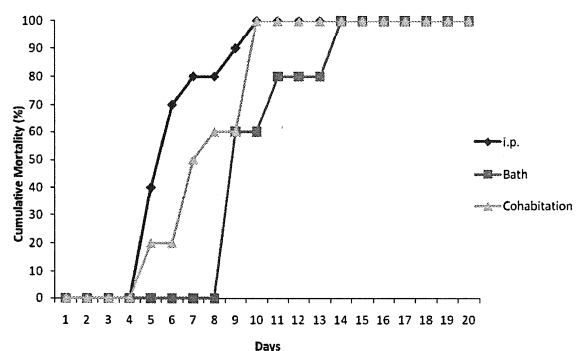


Fig. 2. Cumulative mortality (%) in the turbot experiments by different inoculation routes employing the ACC35.1 strain with a dose of 1×10^4 CFU/g (i.p. and cohabitation assays) or mL (bath experiments). Negative control groups showed 0% mortality during the experiment.

these *E. tarda* isolates were also able to infect turbot and sole by water route (Table 2). In this case, the LD₅₀ values were around 10³ CFU/mL for turbot and 10⁴ CFU/mL for sole, and fish died between day 8 and 14 (Fig. 2). Therefore, as occurs in the majority of fish pathogens, the degrees of virulence by bath were always lower than those found when the fish were inoculated by intraperitoneal injection²²⁾.

With regard to cohabitation assays, the results showed that whereas in the inoculated fish mortalities started in day 4, deaths in not inoculated fish began by day 6 and reached the 100% in 4 or 5 days (Fig. 2).

The results obtained in bath and cohabitation experiments indicates that *E. tarda* can remain in the aquatic environment maintaining its capacity to infect fish and that horizontal transmission play an important role in the development of the edwardsiellosis, especially in aquaculture industry where high population densities are common.

The demonstrated lack of host specificity for the turbot strains of *E. tarda* is in accordance with the data previously reported by Xiao *et al.*²³⁾ employing Chinese turbot strains for swordtail fish *Xiphophorus helleri*. However, other previous studies described little or not pathogenicity of some *E. tarda* strains isolated from Japanese flounder, Japanese eel and tilapia to red sea bream¹²⁾.

In addition, the assays performed in mice demonstrated that all the *E. tarda* strains employed were pathogenic for mice, even with LD₅₀ values lower than those showed for the control strain (Table 2). These results indicated that precautionary measures with the fish manipulation and other routine tasks in the aquaculture industry should be of great importance to avoid the possibility of zoonoses. In fact, Van Damme and Vandepitte²⁴⁾, and Vandepitte *et al.*²⁵⁾, reported that this pathogen could be transmitted to humans and cause infections from fishes or water.

With regard to the statistical analysis, significant differences ($p < 0.05$) (Chi-square test) among different replica were not found in all the experiments developed.

Acknowledgements

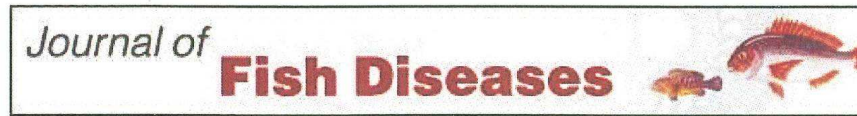
This work was supported in part by Grant No. AG2009-08859 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain). We thank J.B. Peleteiro from the

Instituto Español de Oceanografía (IEO), Vigo, Spain and Insuñía SL for the kind supply of fish for the experimental assays in this work. We thank the donors for the kindly supply of *E. tarda* strains from eel, tilapia, striped bass, flounder and red sea bream.

References

- 1) Castro N., A. E. Toranzo, J. L. Barja, S. Núñez and B. Magariños (2006): *J. Fish Dis.*, **29**, 541–547.
- 2) Padrós F., C. Zarza, L. Dopazo, M. Cuadrado and S. Crespo (2006): *J. Fish Dis.*, **29**, 87–94.
- 3) Sahoo, P. K. and B. R. Mohanty (2007): *J. Biosci.*, **32**, 1331–1344.
- 4) Austin, B. and D. A. Austin (1999): *Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish* 3rd ed. Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 13–15.
- 5) Plumb, J. A. (1993): In: "Bacterial Diseases of Fish" (ed. by V. Inglis, R. J. Roberts and N. R. Bromage). Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 61–79.
- 6) Park, S. (1989): *J. Fish Pathol.*, **2**, 83–90.
- 7) Nucci, C., W. D. da Silveira, S. da Silva Corrêa, G. Nakazato, S. Y. Bando, M. A. Ribeiro and A. F. Pestana de Castro (2002): *Vet. Microbiol.*, **89**, 29–39.
- 8) Rashid, M. M., K. Honda, T. Nakai and K. Muroga (1994): *Fish Pathol.*, **29**, 221–227.
- 9) Muratori, M. C. S., A. L. de Oliveira, L. P. Ribeiro, R. C. Leite, A. P. R. Costa and M. C. C. da Silva (2000): *Aquacult. Res.*, **31**, 481–483.
- 10) Du, M., J. Chen, X. Zhang, A. Li, Y. Li and Y. Wang (2007): *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 1349–1354.
- 11) Castro, N., A. E. Toranzo, S. Devesa, A. González, S. Núñez and B. Magariños (2010): *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* submitted manuscript.
- 12) Matsuyama, T., T. Kamaishi, N. Ooseko, K. Kurohara and T. Iida (2005): *Fish Pathol.*, **40**, 133–135.
- 13) Han, H. J., D. H. Kim, D. C. Lee, S. M. Kim and S. I. Park (2006): *J. Fish Dis.*, **29**, 601–609.
- 14) Castro, N., A. E. Toranzo, S. Núñez, C. R. Osorio and B. Magariños (2010): *Dis. Aquat. Org.*, **90**, 55–61.
- 15) Thoesen, J. (1994): Suggested Procedures for the Detection and Identification of Certain Finfish and Shellfish Pathogens. Blue Book 4th Edition. Fish Health Section, American Fisheries Society.
- 16) Reed, L. J. and H. Muench (1938): *Am. J. Hyg.*, **27**, 493–497.
- 17) Toranzo, A. E., J. L. Barja, S. A. Potter, R. R. Colwell, F. M. Hetrick and J. H. Crosa (1983): *Infect. Immun.*, **39**, 1220–1227.
- 18) Osorio, C. R., J. L. Romalde, J. L. Barja and A. E. Toranzo (2000): *Microb. Pathog.*, **28**, 119–126.
- 19) Herman, R. L. and G. L. Bullock (1986): *Trans. Am. Fish. Soc.*, **115**, 232–235.
- 20) Baya, A. M., J. L. Romalde, D. E. Green, R. B. Navarro, J. Evans, E. B. May and A. E. Toranzo (1997): *J. Wildlife Dis.*, **33**, 517–525.
- 21) Zheng, D., Z. Mai, S. Liu, L. Cao, Z. Liufu, W. Xu, B. Tan and W. Zhang (2004): *Aquacult. Res.*, **35**, 494–500.
- 22) Magariños, B., A. E. Toranzo and J. L. Romalde (1996): *Annu. Rev. Fish Dis.*, **6**, 41–64.
- 23) Xiao, J., Q. Wang, Q. Liu, X. Wang, H. Liu and Y. Zhang (2009): *Aquacult. Res.*, **40**, 13–17.
- 24) Van Damme, L. R. and J. Vandepitte (1980): *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 475–479.
- 25) Vandepitte, J., P. Lemmens and L. de Swert (1983): *J. Clin. Microbiol.*, **17**, 165–167.

Journal of Fish Diseases



First description of *Edwardsiella tarda* in sole (*Solea senegalensis*)

Journal:	<i>Journal of Fish Diseases</i>
Manuscript ID:	JFD-2011-49.R1
Manuscript Type:	Short Communication
Date Submitted by the Author:	09-Jun-2011
Complete List of Authors:	Castro, Nuria; Universidad de Santiago de Compostela, Microbiología Toranzo, Alicia; Universidad de Santiago de Compostela, Microbiología y Parasitología Devesa, Sergio; Acuacria Arousa González, Andrés; Acuacria S.L., Research and Development Nuñez, Soledad; Universidad de Santiago de Compostela, Microbiología y Parasitología Magariños, Beatriz; universidad de Santiago de Compostela, microbiología

SCHOLARONE™
Manuscripts

1 **First description of *Edwardsiella tarda* in Senegalese sole, *Solea senegalensis***
2 **(Kaup)**

3

4 **N. Castro^{1*}, A. E. Toranzo¹, S. Devesa², A. González², S. Nuñez¹ & B. Magariños¹**

5

6 ¹Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Biología-CIBUS,
7 Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, 15782 Spain.

8 ²Aquacría S.L. Bico da Ra. Castrelo. Pontevedra. 36639. Spain

9

10

11 Short Communication

12

13

14

15 *Corresponding author e-mail: nuria.castro@usc.es

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27 *Keywords: Edwardsiella tarda*, fish pathogens, *Solea senegalensis*, aquaculture.

28

29 *Edwardsiella tarda* is a gram negative, motile and rod-shaped bacterium,
30 member of the family *Enterobacteriaceae*. *E. tarda* has been isolated from a great
31 variety of fish species, shellfish, reptiles, amphibians, birds, mammals and from the
32 environment contaminated by animals or the man. Although first descriptions of *E.*
33 *tarda* hypothesized that infections occurred preferentially in warm water temperatures
34 (Plumb 1999), subsequent studies described edwardsiellosis in water temperatures
35 between 10-18°C and cold seasons (Liu & Tsai, 1980; Castro, Toranzo, Barja, Núñez &
36 Magariños 2006). In the last years, edwardsiellosis caused by *E. tarda* has had a serious
37 effect in fish culture, being considered as one of the important emergent pathogens in
38 European turbot *Psetta maxima* (L.) aquaculture (Castro *et al.* 2006; Toranzo 2007).

39 The Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup) is of great interest to
40 aquaculture because of its relatively fast growth and good commercial prospects. It is
41 highly demanded in the market having a high commercial value and it would permit
42 a more diversified offer from the aquaculture producers. At present, pasteurellosis
43 (*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*) (Magariños, Romalde, Lopez-Romalde,
44 Morinigo & Toranzo 2003), vibriosis (i.e. *Vibrio harveyi*) (Rico, Tapia-Paniagua,
45 Martínez-Manzanares, Balebona & Morinigo 2008) and tenacibaculosis (i.e.
46 *Tenacibaculum maritimum*) (Cepeda & Santos, 2002) are considered the most important
47 bacterial pathogens affecting sole cultures. However, as it happens with other fish
48 cultures, once these pathologic problems by the development of prophylactic measures
49 and/or suitable vaccination programs, other new diseases could gain prominence. In this

50 work, we report the first case of edwardsiellosis caused by *Edwardsiella tarda* ¿as an
51 etiological agent? in farmed Senegalese sole.

52 During the spring of 2010 an episode of mortality occurred in 100 g sole reared
53 in a marine farm in Galicia (Northwestern Spain), water temperature was around 17° C
54 and salinity 32‰. In the rearing facility turbot was also cultured using the same water
55 recirculation system but in different tanks. Examination of dead fish in the farm
56 revealed the presence of cutaneous lesions in the dorsal surface, tumefactions around
57 the eyes and hemorrhages in their ventral zone. Affected sole were captured and sent to
58 the laboratory for microbiological analysis. Fishes were euthanized with tricaine
59 methanesulfonate (MS-22), necropsied under aseptical conditions and examined for
60 internal lesions. Sole presented abundant ascitic fluid, anemic liver and kidney with
61 petechial haemorrhages.

62 In order to determine the causative agent of this pathology, a group of 30
63 affected fish were subjected to routine microbiological analysis. Internal organs (spleen,
64 liver and kidney) as well as external lesions were streaked onto Trypticase Soy Agar
65 plates with 1 % of NaCl (TSA-1) (Difco Laboratories, Detroit, Mich.), Blood Agar
66 plates (BioMérieux, Spain) and FMM (Flexibacter Maritimum Medium; Pazos, Santos,
67 Macías, Núñez & Toranzo 1993) and incubated at 25°C. Wet mounts of gills and lesions
68 were observed with a phase-contrast microscope to determine the possible presence of
69 filamentous bacteria.

70 Six representative isolates from different fish, obtained from plates, were
71 subjected to biochemical, serological and molecular characterization in order to identify
72 the causative agent of the infection. Biochemical characterization was performed
73 employing standard physiological and biochemical tube and plate tests (Amos 1985)
74 and the commercial miniaturized system API20E (BioMérieux, Spain). Moreover, drug

75 sensitivity to antimicrobial compounds was assayed by the disc diffusion method on
76 Müller Hinton Agar (MHA) (Oxoid) following the CLSI recommendations (CLSI,
77 2009). The following chemotherapeutic agents (micrograms per disc) were used:
78 flumequine (30), nitrofurantoina (300), florfenicol (30), enrofloxacin (5), oxytetraciclina
79 (30), amoxicilina (25) and trimetoprim-sulfametoxazol (23.75/1.25). MHA plates
80 were incubated at 25°C during 24 h.

81 Serological identification was conducted by slide agglutination test as previously
82 described (Toranzo, Baya, Roberson, Barja, Grimes & Hetrick 1987) employing the
83 thermostable “O” antigen which was obtained by heating the bacterial suspension (10%
84 v/v in PBS) at 100°C for 1 h. Specific antiserum obtained against collection *E. tarda*
85 strain ACC35.1 (isolated from turbot) was employed (Castro *et al.* 2006). Moreover,
86 DNA from bacterial cultures was subjected to PCR with specific primers *etfD* using
87 DNA from the *E. tarda* strain ACC35.1 as positive control (Castro, Toranzo, Núñez,
88 Osorio & Magariños 2010).

89 In parallel to microbiological analysis, samples of spleen, liver, kidney and from
90 external lesions were collected and subjected to genomic DNA isolation employing the
91 commercial kit Easy-DNA™ (Invitrogen, Groningen, Netherland). DNA samples were
92 employed for PCR analysis using the specific primers for *E. tarda* (*etfD*, Castro *et al.*
93 2010) and for other important bacterial pathogens for sole: *T. maritimum* (MAR1-
94 MAR2, Avendaño-Herrera, Magariños, Toranzo, Beaz & Romalde 2004); *V. harveyi*
95 (*toxRF1-toxRR1*, Pang, Zhang, Zhong, Chen, Li & Austin 2006) and *Ph. damsela*
96 *subsp. piscicida* (Car1-Car2, Osorio, Collins, Toranzo, Barja & Romalde 1999). “In
97 vitro” infected kidney with the collection strains *E. tarda* ACC35.1 (Castro *et al.* 2006),
98 *V. harveyi* ATCC14126 (Pang *et al.* 2006); *T. maritimum* NCIMB 2154 (Avendaño-

99 Herrera *et al.* 2004) and *Ph. damsela* subsp. *piscicida* DI21 (Osorio *et al.* 1999) were
100 employed as positive controls.

101 Isolates of *E. tarda* were also subjected to serological and molecular typing
102 employing Dot Blot and RAPD techniques. The Dot Blot assay (Cipriano, Pyle,
103 Starliper & Pyle 1985) was performed using specific antisera obtained against ACC35.1
104 and 9.8 strains from turbot and striped bass (*Morone saxatilis*), respectively, (Castro *et*
105 *al.* 2006). Molecular typing was developed employing RAPD analysis with primer P4
106 using representative isolates (ACC35.1 and HL 23.1) belonging to the two clones
107 described previously in *E. tarda* from turbot (Castro *et al.* 2006).

108 In order to determine the pathogenic potential of the strains isolated from sole, a
109 representative strain (ACR419.1) was selected to perform intraperitoneal (i.p.)
110 challenges. The assays were carried out with sole of 100 g average weight. Prior
111 inoculation, fish were analyzed by classical procedures (Thoesen 1994) to determine if
112 they were free of any bacterial pathogen that could interfere in the results of the
113 experimental infections. Fish were acclimated to the experimental conditions for 7 days
114 between their arrival to the laboratory and the start of the inoculations. According to the
115 procedures of Toranzo, Barja, Potter, Colwell, Hetrick & Crosa (1983), three replicas of
116 10 fish per group were i.p. inoculated with 0.1 ml of 10-fold dilutions ranging from 10^5
117 to 10^7 CFU/ml of the *E. tarda* strain. Control fish were inoculated with sterile SS (NaCl
118 0.85%). Inoculated and control fish were distributed in 5-liter aquaria with continuous
119 aeration and maintained at 18°C with a heater. Each day, the aquaria were monitored
120 and dead fish were counted and removed. Samples of kidney were collected from all
121 dead fish to re-isolate the bacterium inoculated. The Ethics Committee for Animal
122 Experiments of the University of Santiago de Compostela (Spain) approved the
123 protocols used in this study.

124 After 24 h incubation, positive pure bacterial growth was obtained from internal
125 organs as well as external lesions of the diseased sole. Plates exhibited large amounts of
126 bacterial growth from which a single type of motile, small rod bacterium was isolated.
127 No filamentous bacteria were observed at microscopy from gills or external lesions. The
128 six representative isolated strains were Gram negative, cytochrome-oxidase negative,
129 indol positive, gas glucose positive and hydrogen sulfide positive in triple sugar iron
130 agar. The other tests realized showed identical results as those reported by Castro *et al.*
131 (2006) for *E. tarda* turbot isolates. These characteristics provided a presumptive
132 identification as *E. tarda* that was confirmed by the generate profile in the API20E
133 (4744000) and a positive agglutination reaction in slide agglutination test. In addition,
134 PCR analysis employing specific primers *etfD* (Castro *et al.* 2010) showed the expected
135 445 pb band (Fig 1). Drug sensitivity test indicated that the *E. tarda* strains were
136 sensitive to all the chemotherapeutic agents tested.

137 In virulence assays performed in laboratory the representative *E. tarda* isolate
138 caused 100% mortality in sole with all the doses inoculated. Therefore, *E. tarda* strain
139 from sole presented a high degree of virulence, with a LD₅₀ lower than 10² cel/g of fish.
140 Moreover, the fact that none other bacteria were detected neither on plate culture nor in
141 PCR assays conducted with fish tissues (data not shown) supports that *E. tarda* was the
142 causative agent of the infection in sole.

143 When serological characterization of *E. tarda* strains was performed, the results
144 showed that these isolates from sole belonged to the same serological group that the
145 turbot isolates previously described by Castro *et al.* (2006) (Fig 2). On the other other
146 hand, profiles obtained employing the RAPD technique with primer P4, grouped sole
147 strains into one of the two clonal lineages described by Castro *et al.* (2006) for the
148 turbot isolates (Fig 3).

149 Although it is difficult to establish the origin of edwardsiellosis in sole,
150 according to the results obtained in this work and the high homogeneity observed
151 between turbot and sole *E. tarda* strains, we can hypothesize that the possible origin of
152 this disease in sole could be the cohabitation in the same culture system with turbot
153 carrying *E. tarda*.

154

155 **Acknowledgements**

156 This work was supported in part by Grants 08MMA018E and AGL2009-08859 from
157 Xunta de Galicia and Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain) respectively.

158

159

160 **References**

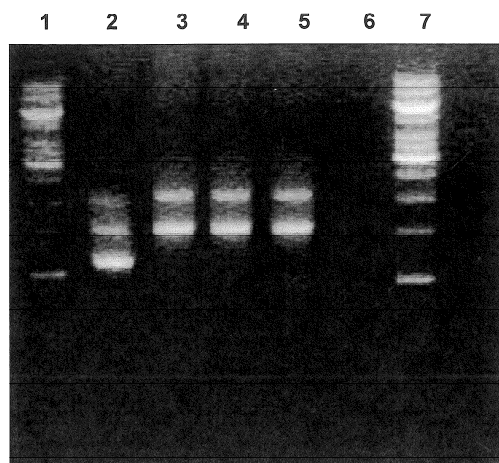
- 161 Amos K.H. (1985) Procedures for the detection and identification of certain fish
162 pathogens. 3rd Fish Health Section, American Fisheries Society, edition.
163 Corvallis, Oregon, USA.
- 164 Avendaño-Herrera R., Magariños B., Toranzo A.E., Beaz R. & Romalde J.L. (2004)
165 Species-specific polymerase chain reaction primer sets for the diagnosis of
166 *Tenacibaculum maritimum* infection. *Diseases of Aquatic Organisms* **62**, 75–83.
- 167 Castro N, Toranzo AE, Barja JL, Núñez S & Magariños B (2006) Characterization of
168 *Edwardsiella tarda* strains isolated from turbot, *Psetta máxima* (L.). *Journal of*
169 *Fish Diseases* **29**, 541-547.
- 170 Castro N., Toranzo A.E., Núñez S., Osorio C. & Magariños B (2010) Evaluation of
171 different Polymerase Chain Reaction primers for the detection of *Edwardsiella*
172 *tarda* in turbot. *Diseases of Aquatic Organisms* **90**, 55-61.
- 173 Cepeda C. & Santos Y. (2002) First isolation of *Flexibacter maritimus* from farmed
174 Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) in Spain. *Bulletin of European*
175 *Association of Fish Pathology* **22**, 388–392.
- 176 Cipriano R.C., Pyle J.B., Starliper C.E. & Pyle S.W. (1985) Detection of *Vibrio*
177 *anguillarum* antigen by dot blot assay. *Journal of Wildlife Diseases* **21**, 211-218.

- 178 CLSI, 2009. Performance standard for antimicrobial disk susceptibility test. 10th ed.
179 Approved Standard MO2-A10. Clinical and Laboratory Standards Institute.
180 Wayne, P.A.
- 181 Lui C.I. & Tsai S.S. (1980). Edwardsiellosis in pond cultured eel in Taiwan. CAPD
182 Fisheries Series No. 3, Reports on Fish Disease Research 3, 109-115.
- 183 Magariños B., Romalde J.L., Lopez-Romalde S., Morinigo M.A. & Toranzo A.E.,
184 (2003) Pathobiological characterization of *Photobacterium damsela* subsp.
185 *piscicida* strains isolated from cultured sole (*Solea senegalensis*) *Bulletin of*
186 *European Association of Fish Pathology* **23**, 183–190.
- 187 Osorio C.R., Collins M.D., Toranzo A.E., Barja J.L. & Romalde J.L. (1999) 16S
188 rRNA gene sequence analysis of *Photobacterium damsela* and nested PCR
189 method for the rapid detection of the causative agent of fish pasteurellosis.
190 *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 2942–2946
- 191 Pang L., Zhang X-H., Zhong Y., Chen J., Li Y. & Austin B. (2006) Identification of
192 *Vibrio harveyi* using PCR amplification of the *toxR* gene. *Letters in Applied*
193 *Microbiology* **43**, 249-255.
- 194 Pazos F., Santos Y., Macías A. R., Núñez S. & Toranzo A. E. (1993) Evaluation of
195 media for the successful culture of *Flexibacter maritimus*. *Journal of Fish*
196 *Diseases* **19**, 193-197.
- 197 Plumb J.A. (1999) *Edwardsiella* septicemias. In: Fish Diseases and Disorders (Woo
198 PTK, Bruno DW, Eds.). Cabi Publishing, Wallingford (UK).
- 199 Rico R.M., Tapia-Paniagua S., Martínez-Manzanares E., Balebona M.C. & Moriñigo
200 M.A. (2008) Characterization of *Vibrio harveyi* strains recovered from diseased
201 farmed Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Journal of Applied Microbiology*
202 **105**, 752-60.
- 203 Thoesen J.C. (1994) Suggested procedures for the detection and identification of
204 certain finfish and shellfish pathogens. Fish Health Section, American Fisheries
205 Society, 4th edition, version 1. Bethesda, Maryland, USA.
- 206 Toranzo A.E., Barja J.L., Potter S.A., Colwell R.R., Hetrick F.M. & Crosa J.H. (1983)
207 Molecular factors associated with the virulence of marine vibrios isolated from
208 striped bass in Chesapeake Bay. *Infection and Immunity* **39**, 1220-1227.
- 209 Toranzo A.E., Baya A.M., Roberson B.S., Barja J.L., Grimes D.J. & Hetrick F.M.
210 (1987) Specificity of the slide agglutination test for detecting bacterial fish
211 pathogens. *Aquaculture* **61**, 81-97.

- 212 Toranzo A.E. (2007) Enfermedades bacterianas emergentes en cultivos marinos de
213 peces. In: Cerviño, A., Guerra, A., Pérez, C. (Eds.), Actas del XI Congreso
214 Nacional de Acuicultura, Vigo (Spain). 2, 951-956.
215
216

255 Figure 3.- Results of the RAPD using primer P4. Lanes 1 and 7: GeneRuler™ 1 kb
256 DNA Ladder, ready-to-use, (250-10,000 bp ladder, Fermentas); Lane 2: turbot strain
257 ACC35.1 (clon I); lane 3: turbot strain HL23.1 (clon II); lanes 4 and 5: representative
258 sole isolates; lane 6: negative control.

259



260

261

262

263

Sección 6

Técnicas de diagnóstico de la edwardsielosis

6.1.- INTRODUCCIÓN

A pesar de que los síntomas clínicos descritos para las infecciones causadas por *E. tarda* suelen ser característicos y fácilmente reconocibles, no constituyen una herramienta útil en el diagnóstico de la enfermedad debido a que la mayoría de ellos pueden ser asociados también con otro tipo de patologías bacterianas. Es por eso que se hace necesario el diagnóstico de la enfermedad mediante diversas técnicas que permitan la detección del agente etiológico, bien sea en base al aislamiento en medios de cultivo y su posterior identificación mediante métodos convencionales, o bien empleando otras técnicas moleculares.

6.1.1.- Diagnóstico tradicional de *Edwardsiella tarda*:

El diagnóstico tradicional de la enfermedad empleando pruebas bioquímicas convencionales en tubo y placa se basa en el aislamiento primario del patógeno *E. tarda* a partir de órganos internos (riñón, hígado, bazo, ...) en medios de cultivo generales como Tripticasa de Soja Agar (TSA), Agar Sangre (AS) o Agar Marino (AM), entre otros. El período de incubación suele ser de 24 h a una temperatura de 25°C (37°C para el caso de animales homeotermos).

Además de los medios de cultivo generales, *E. tarda* puede ser también aislada empleando medios que contienen algún sustrato fermentable como pueden ser la sacarosa o la lactosa (McConkey; XLD [xylose-lysine-desoxycholate]; SS agar [*Salmonella-Shigella* Agar]; DC [desoxycholate citrate]) y donde las colonias de *E. tarda* toman el color del medio. En aquellos medios que incorporan detectores de H₂S, las colonias presentan un punto negro en el centro, indicando la producción de H₂S.

En 1973, Muyembe y col., describieron que las cepas de *E. tarda* eran resistentes a la colistina, sugiriendo que la incorporación de este antibiótico polipeptídico a un medio de cultivo empleado habitualmente en el aislamiento de bacterias entéricas podría potenciar el aislamiento de *E. tarda*. En base a ello, Lindquist (1991) diseñó un nuevo medio de aislamiento: Agar *Edwardsiella tarda* (ET agar), añadiendo entre otros componentes, colistina al agar McConkey. En él, las colonias

aparecían de color claro, con un punto negro en el centro tras 24 h de incubación a 37° C (Lindquist, 1991).

El diagnóstico presuntivo de *E. tarda* se basa en el aislamiento de bacilos Gram negativos, generalmente móviles, oxidasa negativos, que fermentan la glucosa y producen indol a partir del triptófano.

Además de la utilización de las pruebas bioquímicas convencionales en tubo y placa, también resultan muy útiles para la identificación de este patógeno, determinados sistemas comerciales como pueden ser los sistemas miniaturizados tipo API20E (Biomerieux) los cuales incluyen los perfiles de la especie *E. tarda* en su base de datos.

Las técnicas serológicas se pueden emplear también con eficacia para la detección del patógeno y/o diagnóstico de la enfermedad. Estas técnicas emplean generalmente como anticuerpos antiseros específicos obtenidos en conejo frente a células formolizadas de *E. tarda*. Los resultados presentados (ver Sección 3) en esta tesis muestran que la técnica de aglutinación en portaobjetos empleando bien células bacterianas enteras o bien antígeno O, resulta una técnica rápida y eficaz para la pronta identificación de *E. tarda*, si bien, no permite la diferenciación entre serotipos de la especie.

Se han empleado también otros tipos de técnicas para la detección y seguimiento de esta bacteria. Rogers en 1981 publicó un trabajo donde comparaba dos técnicas inmunológicas como eran la EIA (ensayos inmunoenzimáticos) y la FAT (inmunoensayos con anticuerpos fluorescentes) para la detección de *E. tarda* y *E. ictaluri* en diferentes muestras de pez gato.

6.1.2.- Diagnóstico molecular de *Edwardsiella tarda*:

A pesar de que *E. tarda* es una especie bacteriana fácilmente cultivable y su identificación mediante pruebas bioquímicas no resulta demasiado compleja ni laboriosa, en muchas ocasiones se hace necesaria la detección del patógeno de una forma más rápida y sensible para poder dar un diagnóstico en el menor tiempo posible a fin de evitar pérdidas económicas en la industria acuícola.

Chen y Lai en 1998 diseñaron una pareja de cebadores basados en la secuencia del gen de la hemolisina que amplificaba un fragmento de 1109 pb de la región de las ORF II y III del gen de la hemolisina. La evaluaron empleando una colección de cepas procedentes de Taiwan, en su mayoría aisladas a partir de anguila, y muestras de peces y agua infectados experimentalmente.

Sakai y col. (2007) evaluaron la utilidad de cuatro parejas de cebadores (etfA, etfB, etfC and etfD) para determinar la presencia o ausencia de genes presensores de fimbrias en un grupo de cepas de *E. tarda* virulentas y no virulentas aisladas de peces. Buscaban establecer una posible relación entre la presencia de fimbrias y la virulencia de las cepas. Aunque estos cuatro cebadores no fueron evaluados como un método de diagnóstico, en base a los resultados obtenidos, solamente dos de las parejas (etfA y etfD) podrían ser útiles para el diagnóstico de *E. tarda*.

Más recientemente, Lan y col. (2008) diseñaron una pareja de cebadores en base a la secuencia del gen *gyrB*, y la evaluaron empleando 9 cepas de referencia de distintas especies, entre las que se encontraba una de *E. tarda*. Encontraron que dichos cebadores amplificaban solamente la cepa de *E. tarda* pero no el resto de cepas ensayadas.

En ninguna de estas tres publicaciones se empleó un rango amplio de cepas de *E. tarda* aisladas de diferentes hospedadores y orígenes geográficos, ni se determinaron los límites de detección de los cebadores ni se evaluó su posible uso en campo para la detección de este patógeno.

En los últimos años se han publicado también otros métodos de diagnóstico molecular para la detección de *E. tarda*, como es el caso del LAMP (loop-mediated isothermal amplification) (Savan y col., 2005). El LAMP es un sistema para la amplificación de ácidos nucleicos que utiliza 6 cebadores diferentes, que reconocen determinadas regiones de la secuencia diana y se unen a ellas. Ootsubo y col. (2002) desarrollaron una técnica de hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH) empleando una sonda que permitía la detección de células bacterianas pertenecientes a la familia de la Enterobacterias, incluyendo *E. tarda*, sin dar ningún falso positivo. Otra técnica de detección es la HPEC (high-performance capillary electrophoresis), que identifica y cuantifica células bacterianas. Mediante esta técnica, Yu y col. (2004) fueron capaces de detectar *E. tarda* en peces y hacer el seguimiento de la bacteria tras su inyección en el pez.

En cuanto a la detección simultánea de *E. tarda* junto con otros patógenos, hasta la fecha solamente tenemos conocimiento de un trabajo realizado por Chang y col. (2009), en el que desarrollan una técnica de Multiplex-PCR para la detección de *Aeromonas hydrophila*, *E. tarda*, *Photobacterium damsela* y *Streptococcus iniae*, cuatro patógenos de importancia en las zonas subtropicales de Asia.

En esta sección nos propusimos evaluar un medio de cultivo selectivo para el aislamiento de *E. tarda*, un método de PCR que permita el diagnóstico de la bacteria de forma sensible y rápida y un protocolo de multiplex-PCR (m-PCR) para la detección simultánea de *E. tarda* con otros patógenos bacterianos importantes en la actualidad en los cultivos de rodaballo y lenguado.

6.2.- MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1.- Evaluación de medios de cultivo:

En este apartado se evaluaron en paralelo dos medios selectivos para el aislamiento y detección de *E. tarda*, y su posible utilidad en estudios epidemiológicos. Los medios seleccionados fueron el medio de cultivo comercial SS-agar (*Salmonella-Shigella* agar) (Difco, USA) y el medio ET desarrollado por Lindquist (1991) (Tabla 6.1).

El medio SS-agar es un medio selectivo y diferencial que inhibe el crecimiento de microorganismos gram positivos por su contenido en sales biliares, verde brillante y citratos. Además, en él se pueden diferenciar bacterias entéricas en base a la fermentación o no de la lactosa (los organismos fermentadores producirán ácido que resulta en la formación de colonias rojizas, los no fermentadores aparecerán como colonias sin color). El tiosulfato sódico y el citrato férrico que también forman parte de este medio permitirán la detección de organismos productores de sulfuro de hidrógeno mediante la aparición de un centro negro en las colonias.

El medio ET fue desarrollado por Lindquist para el aislamiento selectivo y diferencial de *E. tarda*. El medio fue diseñado teniendo en cuenta características bioquímicas típicas de *E. tarda* como la decarboxilación de lisina, la formación de sulfuro de hidrógeno a partir de tiosulfato y la no fermentación de manitol y sacarosa. Así, teóricamente la diferenciación de *E. tarda* de otras especies de enterobacterias sería más fácil en un medio que contuviese lisina, manitol, sacarosa, un indicador de pH y un sistema de detección de sulfuro de hidrógeno. Además, la inclusión de colistina en el medio restringiría el crecimiento de muchas especies de enterobacterias (Muyembe y col., 1973).

Utilizamos también en estos ensayos dos medios generales de uso común en laboratorios de ictiopatología: el TSA-1 (tripticosa soja agar suplementado con ClNa al 1%) (Difco, USA) y el AM (agar marino) (Difco, USA), como medios control para el crecimiento de las distintas especies ensayadas.

Tabla 6.1.- Preparación del medio Agar *Edwardsiella tarda***Medio ET para aislamiento de *E. tarda* (Lindquist, 1991)**

Agar MacConkey	40.0 g
Extracto de levadura	1.0 g
Agar	4.5 g
Agua destilada	900 ml
Autoclavar, dejar enfriar y añadir la siguiente dilución esterilizada dos veces por filtración:	
Glucosa	2.0 g
Sacarosa	5.0 g
Manitol	5.0 g
Xilosa	5.0 g
L-Lisina	10.0 g
Tiosulfato sódico	6.8 g
Sulfato amónico férrico	0.8 g
Agua destilada	100.0 ml
Colistina (1mg/ml)	10.0 ml

La colección de cepas bacterianas empleadas se muestra en la Tabla 6.6 (pag. 170) e incluye 13 cepas de *E. tarda* aisladas a partir de distintos orígenes geográficos y diferentes hospedadores. También se incluyeron en esta colección otras especies bacterianas procedentes de distintos orígenes.

Para la realización del ensayo, se determinó, para cada una de las cepas la capacidad de crecimiento en los distintos medios de cultivo empleados. Para ello, se calculó el valor final de la dilución bacteriana en el cual se podía observar crecimiento (Daly & Stevenson, 1985).

La preparación de los inóculos se realizó resuspendiendo las bacterias en SS y ajustando a una concentración inicial de aproximadamente $1,2 \times 10^9$ cels/ml por comparación de la turbidez de la suspensión con el tubo 4 de la escala McFarland. A continuación, se realizaron diluciones seriadas en SS para cada una de las cepas, y se sembraron 100 μ l de la suspensión inicial de cada dilución (desde

10^{-2} a 10^{-9}) en cada uno de los cuatro medios empleados. Las placas se incubaron a 25°C durante 48 h y cada una de las cepas se evaluó por triplicado.

Se realizaron también cultivos mixtos de *E. tarda* con otras especies bacterianas empleando las cepas: *Hafnia alvei* (15/1403), *Yersinia ruckeri* (1651), *A. hydrophila* (X177) *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* (ACR218.1), *V. anguillarum* (R82), *T. maritimum* (ACC13.1) y *E. ictaluri* (CECT885). Para ello, se mezclaron volúmenes iguales de las diferentes diluciones de suspensiones bacterianas de *E. tarda* (ACC35.1) y las otras cepas probadas. El protocolo seguido para la realización de las diluciones fue el mismo que el descrito en el párrafo anterior.

Para determinar la validez de los medios SS-agar y ET en el aislamiento de *E. tarda* a partir de tejidos, se realizó un ensayo de aislamiento a partir de tejidos infectados experimentalmente. Se emplearon muestras de 1 g de riñón de rodaballo que fueron asépticamente homogeneizados con 100 µl de solución salina e inoculados con 100 µl de diferentes diluciones de una suspensión bacteriana de la cepa ACC35.1. Se incubaron las muestras durante 1 h a temperatura ambiente y, a continuación, se sembraron 100 µl de cada muestra en placas de SS-agar y ET que se incubaron a 25°C durante 24-48 h. De cada una de las placas, se seleccionaron 10 colonias al azar que presentaban la morfología típica de *E. tarda* y se identificaron mediante test bioquímicos y aglutinación en portaobjetos empleando antisueros específicos.

Además, se realizó también una evaluación de estos medios con la finalidad de determinar cuál de ellos era más idóneo para el aislamiento y recuperación de *E. tarda* a partir de muestras naturales. Las muestras que se analizaron procedieron de 5 stocks de 10 rodaballos cada uno enviados a nuestro laboratorio de diagnóstico para su análisis. Todos ellos procedían de una misma planta de cultivo en la que se habían registrado previamente brotes de edwardsiellosis. De cada uno de los peces, se sembró a partir de riñón, hígado, bazo y lesiones externas en los cuatro medios de cultivo (TSA-1, AM, SS-agar y ET). Tras incubar las placas durante 24 h a 25°C, se estimó la cantidad de cada tipo de colonia bacteriana y se aislaron en cultivo puro para su posterior identificación. La posición taxonómica de cada cepa se determinó empleando pruebas bioquímicas convencionales. Los resultados se expresaron como porcentaje de cepas pertenecientes a una determinada especie en relación a los aislados totales obtenidos en cada medio de cultivo.

6.2.2.- Evaluación y desarrollo de un protocolo de PCR para la detección de *Edwardsiella tarda*:

a) Evaluación de cebadores:

Para la evaluación de cebadores y desarrollo de un protocolo de PCR que permita la detección de *E. tarda* se emplearon las parejas de cebadores que se muestran en la Tabla 6.2.

Para los estudios de especificidad se utilizó una colección de 92 cepas de *E. tarda*: 75 de ellas aisladas de rodaballo y 17 aisladas de diferentes hospedadores y orígenes geográficos (ver Tablas 3.5 y 3.6, Sección 3), además de un grupo de 18 cepas de otras enterobacterias y patógenos bacterianos marinos (Tabla 6.3).

Tabla 6.2.- Parejas de cebadores empleadas en el estudio para la detección de *E. tarda*

CEBADORES	POSICIONES	GEN	TAMAÑO (pb)	REFERENCIA
tardaF-tardaR 5'-CCTTATAAATTACTCGCT-3' 5'-TTTGTGGAGTAACAGTTT-3'	744-761 1850-1833	ORFII-ORFIII (Hemolisina)	1109	Chen & Lai, 1998
etfA 5'-CGGTAAAGTTGAGTTTACGGGTG-3' 5'-TGTAACCGTGTGGCGTAAG-3'	2160-2182 2555-2574	etfA (Subunidad menor de la fimbria)	415	Sakai y col., 2007
etfD 5'-GGTAACCTGATTGGCGTTC-3' 5'-GGATCACCTGGATCTTATCC-3'	6171-6190 6596-6615	etfD (Subunidad de la fimbria)	445	Sakai y col., 2007
gyrBF1-gyrBR1 5'-GCATGGAGACCTTCAGCAAT-3' 5'-GCGGAGATTTGCTCTTCTT-3'	242-262 637-656	gyrB (Girasa)	415	Lan y col., 2008

Tabla 6.3.- Otras cepas bacterianas empleadas en la determinación de la especificidad de las parejas de cebadores. ATCC: American Type Culture Collection (Manassas, USA); CECT: Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, Spain); DSM Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (Braunschweig, Germany).

ESPECIE	CEPA	HOSPEDADOR	FUENTE
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	ATCC33202	Pez gato	ATCC
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	B1.1	Boga	Colección Laboratorio
<i>Edwardsiella hoshinae</i>	DSM13771	Frailecillo	DSM
<i>Escherichia coli</i>	CECT433	Hombre	CECT
<i>Enterobacter cloacae</i>	TW83/03	Trucha	Colección Laboratorio
<i>Enterobacter aerogenes</i>	RPM799.1	Rodaballo	Colección Laboratorio
<i>A. salmonicida subsp. salmonicida</i>	ACR218.1	Rodaballo	Colección Laboratorio
<i>Yersinia ruckeri</i>	1651	Trucha	Colección Laboratorio
<i>Yersinia ruckeri</i>	SRG4.1	Trucha	Colección Laboratorio
<i>Hafnia alvei</i>	15/1403	Trucha	Colección Laboratorio
<i>Vibrio anguillarum</i>	R82	Rodaballo	Colección Laboratorio
<i>Ph. damsela subsp. piscicida</i>	ATCC29690	Seriola	ATCC
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	CECT899	Anguila japonesa	CECT
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	07/1139	Trucha	Colección Laboratorio
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CECT110	Desconocido	CECT
<i>Serratia marcescens</i>	PC955.1	Rodaballo	Colección Laboratorio
<i>Lactococcus garvieae</i>	SRG1.1	Trucha	Colección Laboratorio
<i>Streptococcus parauberis</i>	ACC33.1	Rodaballo	Colección Laboratorio

La extracción del DNA de todas las cepas bacterianas empleadas se llevó a cabo utilizando la matriz InstaGene Matrix (Bio-Rad, Madrid) de la forma ya descrita anteriormente (ver Sección 4, apartado 4.2.5).

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo empleando el sistema comercial Ready-To-Go™ PCR beads (Amersham Pharmacia Biotech) que incluye todos los componentes necesarios para la reacción de PCR con la única excepción de los cebadores específicos y el DNA. Para cada reacción de PCR se añadió una PCR bead, 1 µl de cada cebador específico (100 µM), 1 µl de DNA y 22 µl de agua destilada triestéril (volumen final de 25 µl). Para la PCR se emplearon dos termocicladores independientes: T Gradient Termocicler (Biometra, Alemania) y T Professional Basic (Biometra, Alemania). Los ciclos de desnaturalización, hibridación y elongación empleados fueron los descritos en la bibliografía para cada pareja de cebadores. Se realizaron, además, controles negativos de cada

reacción que consistieron en la misma mezcla descrita anteriormente pero sustituyendo el DNA por agua destilada. La reproducibilidad de los resultados se comprobó mediante la repetición de las reacciones de amplificación en 3 ensayos independientes y empleando 3 extracciones de DNA procedentes de diferentes placas de cultivo.

Los productos de PCR fueron separados por medio de electroforesis horizontal de la misma forma indicada con anterioridad (ver Sección 4).

b) Determinación de la sensibilidad y aplicación en campo del protocolo seleccionado:

Para la determinación de la sensibilidad de amplificación de la pareja de cebadores seleccionada (etfD) se emplearon tanto cultivos bacterianos puros y mixtos, como diferentes tejidos de rodaballo infectados experimentalmente. Además, se realizaron estudios de detección de *E. tarda* empleando muestras naturales procedentes de plantas de cultivo.

- **Cultivos bacterianos puros y mixtos:**

En el caso de los cultivos bacterianos, la extracción de DNA se realizó empleando la matriz InstaGene (ver Sección 4). Para los cultivos puros, se empleó la cepa de *E. tarda* ACC35.1 sembrada en TSA-1. Las células bacterianas se recogieron con un hisopo y se resuspendieron en SS ajustando a una concentración inicial de aproximadamente $1,2 \times 10^9$ cels/ml por comparación de la turbidez de la suspensión con el tubo 4 de la escala McFarland. A continuación, se realizaron diluciones seriadas en SS y se procedió a la extracción del DNA de cada una de las diluciones.

Para los cultivos mixtos, se emplearon también diluciones seriadas de las cepas R82 (*Vibrio anguillarum*) y ACR218.1 (*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*) obtenidas de la forma descrita en el párrafo anterior. A continuación se mezclaron 500 μ l de cada una de las diluciones (*E. tarda*, *V. anguillarum* y *A. salmonicida*) y se extrajo el DNA de la mezcla.

Todas las diluciones se centrifugaron a 12000 rpm durante 2 min y se lavaron 2 veces con agua destilada estéril, tras lo cual se procedió a la extracción de DNA, amplificación del DNA

mediante PCR y visualización de los productos de amplificación en geles de agarosa horizontales tal y como se describió en apartados anteriores.

La concentración real de las diluciones bacterianas empleadas se calculó sembrando cada dilución en placas de TSA-1 y contando las colonias bacterianas (CFU).

- **Muestras de peces infectadas experimentalmente:**

Con el objetivo de determinar la aplicabilidad del protocolo de PCR seleccionado a la detección de *E. tarda* en muestras de peces, se recogieron diferentes tejidos y fluidos de rodaballos sanos que fueron previamente analizados mediante métodos bacteriológicos convencionales (Thoesen, 1994) con el fin de garantizar la ausencia en los mismos de otros patógenos bacterianos que pudiesen interferir en los experimentos. Los tejidos seleccionados fueron hígado y riñón (1 g), mientras que como fluidos se tomaron muestras de sangre y mucus (200 µl). En el caso de los tejidos, las muestras se homogeneizaron en 100 µl de PBS (pH 7.4) mediante pipeteado. En todos los casos se añadieron 100 µl de diferentes diluciones de un cultivo puro de la cepa ACC35.1 de *E. tarda* y se homogeneizó la suspensión. Tras una incubación de 1 h, la extracción de DNA se realizó empleando el kit comercial Easy-DNA™ (Invitrogen, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizaron también controles negativos que consistieron en las mismas muestras de tejidos y fluidos inoculadas con PBS estéril en lugar de la dilución bacteriana.

Como complemento a estos experimentos, se realizaron también inoculaciones de lotes de 50 rodaballos de 10-12 g de peso mediante inyección intraperitoneal. Las dosis inoculadas fueron 0.1 ml de una suspensión 10^2 cel/ml (aproximadamente 1 cel/g de pez) y 0.1 ml de una suspensión 10 cel/ml (0.1 cel/g de pez) de la cepa ACC35.1 ($LD_{50} = 1.6 \times 10^0$ cel/g de pez; ver Sección 5). Además, como control negativo se inoculó un lote de peces con 0.1 ml de solución salina y se mantuvo en las mismas condiciones que los lotes infectados. Todos los lotes se mantuvieron en acuarios de 50 l a una temperatura de 17°C aproximadamente. A las 24 h, 48 h y 5 días post-infección, se sacrificaron 10 peces de cada lote de los que se extrajeron muestras de riñón, hígado, bazo, intestino, sangre y mucus. De cada una de estas muestras se realizó la extracción de DNA tal y como se describe en el párrafo anterior. Además, y previamente a la extracción de las muestras, se realizaron análisis

bacteriológicos clásicos en los peces sacrificados, para determinar la posible detección en placa de *E. tarda*.

- **Muestras de peces infectadas naturalmente:**

Se analizaron un total de 80 rodaballos llegados a nuestro laboratorio y procedentes de plantas de cultivo en las que se habían producido brotes de edwardsielosis. El peso de los peces varió entre 50 y 200 g. Además, se analizó también un número similar de rodaballos, aparentemente sanos, y enviados a nuestro laboratorio para análisis rutinarios. Se tomaron muestras de riñón, bazo, hígado, intestino, sangre y mucus y se realizó la extracción de DNA empleando el kit Easy-DNA tal y como se describió anteriormente. Al igual que en el caso anterior, de forma paralela, se realizaron análisis bacteriológicos clásicos de los peces para confirmar la presencia o ausencia de *E. tarda*.

6.2.3.- Multiplex-PCR para la detección simultánea de *Edwardsiella tarda*, *Tenacibaculum maritimum* y *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*:

Aunque *E. tarda* ha sido descrita principalmente en los últimos años como causante de importantes mortalidades en los cultivos de rodaballo, recientemente ha sido también aislada a partir de lenguado, otro importante cultivo marino en Europa (Castro y col., 2011a). En este apartado, nos planteamos el diseño de un protocolo de Multiplex-PCR (m-PCR) que permita el diagnóstico simultáneo de esta bacteria con otros patógenos de gran importancia en estas dos especies de peces planos, como son: *Tenacibaculum maritimum* (Avendaño-Herrera y col., 2006) y *Ph. damsela* subsp. *piscicida* (Magariños y col., 2003)

a) Especificidad y sensibilidad de la m-PCR:

En este apartado se utilizaron como controles positivos las cepas de referencia de *T. maritimum* NCIMB2154 y *Ph. damsela* subsp. *piscicida* ATCC29690 y el aislado de rodaballo de *E. tarda* ACC35.1. Estas cepas fueron sembradas en FMM (*Flexibacter maritimus* medium; Pazos y col., 1996) (*T. maritimum*) y TSA-1 (*E. tarda* y *Ph. damsela* subsp. *piscicida*). La extracción de DNA se

realizó con la matriz InstaGene Matrix (Bio-Rad, Madrid) de la forma ya descrita anteriormente (ver Sección 4).

Los cebadores empleados fueron las parejas etfD para la detección de *E. tarda* (Sakai y col., 2007; Castro y col., 2010), car1-car2 para *Ph. damselae* subsp. *piscicida* (Osorio y col., 1999; 2000b) y MAR1-MAR2 para la detección de *T. maritimum* (Toyama, 1996; Avendaño-Herrera y col., 2004). Estas parejas amplifican fragmentos de 445, 267 y 1088 pb respectivamente.

Todas las reacciones de m-PCR se llevaron a cabo empleando el sistema comercial Ready-To-Go™ PCR beads (Amersham Pharmacia Biotech, España). Para cada reacción de PCR se añadió una PCR bead, 1 µl de cada cebador específico (100 µM), 1 µl de DNA de cada una de las cepas control y 16 µl de agua destilada triestéril (volumen final de 25 µl).

Para la determinación de las condiciones óptimas de temperatura y duración de la m-PCR, se evaluaron las dos variables en experimentos independientes y empleando las cepas control de *E. tarda*, *Ph. damselae* subsp. *piscicida* y *T. maritimum*. En primer lugar se determinó la temperatura de hibridación (annealing) adecuada mediante un gradiente de temperaturas (desde 42° a 58°C). También se determinó el número mínimo de ciclos necesarios para la amplificación del producto final (desde 35 a 45 ciclos). Se consideraron como condiciones idóneas aquellas que dieron como resultado una buena intensidad de los amplicones para cada DNA control y no producían amplificaciones inespecíficas. Se obtuvieron los mejores resultados para una temperatura de annealing de 45°C y 35 ciclos de amplificación (Tabla 6.4)

Tabla 6.4.- Protocolo de amplificación de ADN para la m-PCR.

FASE	TEMPERATURA (°C)	DURACIÓN (min)	
Desnaturalización inicial	94	3	
Desnaturalización	94	2	35 ciclos
Hibridación	45	1,5	
Elongación	72	2	
Elongación final	72	7	

La especificidad de la m-PCR se determinó empleando los DNA genómicos de un grupo representativo de 10 cepas de *E. tarda* aisladas de rodaballo, 17 cepas de *E. tarda* procedentes de otros orígenes (Tabla 3.6, Sección 3), 10 cepas de *T. maritimum* aisladas de diferentes hospedadores, las 18 cepas de diferentes especies empleadas en el apartado anterior (Tabla 6.3) y un grupo de aislados pertenecientes a los géneros *Tenacibaculum*, *Vibrio* y *Photobacterium* (Tabla 6.5).

Tabla 6.5.- Cepas pertenecientes a los géneros *Tenacibaculum* empleadas en la determinación de la especificidad de la m-PCR.

ESPECIE	CEPA	ESPECIE	CEPA
<i>T. lutimaris</i>	DSM16505	<i>V. alginolyticus</i>	CCM2575
<i>T. soleae</i>	CECT7292	<i>V. ordalii</i>	NCIMB2167
<i>T. mesophilum</i>	IFO16307	<i>V. splendidus</i>	CECT528
<i>T. gallaicum</i>	CECT7123	<i>V.harveyi</i>	RA58.2
<i>T. skagerrakense</i>	DSM14836	<i>V.campbellii</i>	ATCC25920
<i>T. discolor</i>	NCIMB14278	<i>Ph. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	ATCC 35083
<i>T. amylolyticum</i>	IFO16310	<i>Ph. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	RM 71
<i>T. ovolyticum</i>	NCIMB13127	<i>Ph. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	DI 21

En base a los resultados obtenidos en los estudios de especificidad, se decidió proseguir en los ensayos posteriores empleando solamente las parejas de cebadores etfD (*E. tarda*) y MAR1-MAR2 (*T. maritimum*).

Para la determinación de la sensibilidad de amplificación de la m-PCR se emplearon tanto cultivos bacterianos puros y mixtos, como tejidos de rodaballo infectados experimentalmente.

En el caso de los cultivos bacterianos, la extracción de DNA se realizó empleando la matriz InstaGene (ver Sección 4). Las células bacterianas de las cepas ACC35.1 y NCIMB2154 se recogieron con un hisopo y se resuspendieron en SS ajustando a una concentración inicial de aproximadamente $1,2 \times 10^9$ cel/ml por comparación de la turbidez de la suspensión con el tubo 4 de la escala McFarland. A continuación, se hicieron diluciones seriadas en SS a partir de la suspensión inicial. La concentración real de las diluciones bacterianas se calculó mediante recuento directo de cada dilución en placas de TSA-1 o FMM. Todas las diluciones se centrifugaron a 12000 rpm durante 2 min

y se lavaron 2 veces con agua destilada estéril, tras lo cual se procedió a la extracción de DNA y su amplificación, mediante m-PCR.

Para determinar la sensibilidad de la detección simultánea de los dos patógenos a partir de cultivos mixtos, se emplearon también diluciones seriadas de las cepas control de la forma descrita en el párrafo anterior. A continuación se mezclaron 500 μ l de cada una de las diluciones (*E. tarda* y *T. maritimum*), se extrajo el DNA de la mezcla y se realizó la amplificación mediante m-PCR.

La concentración real de las diluciones bacterianas empleadas se calculó plateando cada dilución en placas de TSA-1 y FMM contando las colonias bacterianas (CFU) y la visualización de los productos de amplificación se realizó en geles de agarosa horizontales tal y como se describió en apartados anteriores.

Con el objetivo de determinar la aplicabilidad del protocolo de PCR seleccionado a la detección de estos dos patógenos en muestras de peces, se emplearon muestras de 1 g de riñón de rodaballos sanos que fueron previamente analizadas mediante métodos bacteriológicos convencionales (Thoesen, 1994) con el fin de garantizar la ausencia en los mismos de otros patógenos bacterianos que pudiesen interferir en los experimentos. Las muestras se homogeneizaron en 100 μ l de PBS (pH 7.4) mediante pipeteado. A continuación, los tejidos se inocularon de tres formas distintas: sólo con *E. tarda*; sólo con *T. maritimum* y con los dos patógenos al mismo tiempo. Para ello, a cada muestra de riñón se añadieron 100 μ l de las diferentes diluciones de cultivos puros de las cepas control (*E. tarda* y *T. maritimum*) y se homogeneizaron las suspensiones mediante pipeteado. Tras una incubación de 1 h, la extracción de DNA se realizó empleando el kit comercial Easy-DNA™ (Invitrogen, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizaron también controles negativos que consistieron en las mismas muestras de tejidos inoculadas con PBS estéril en lugar de la dilución bacteriana.

El posible efecto en la sensibilidad de la m-PCR de grandes cantidades de uno de los dos patógenos frente a cantidades menores del otro se determinó realizando inoculaciones de muestras de 1 g de riñón con 100 μ l de diferentes suspensiones de *E. tarda* y *T. maritimum*. En un caso se añadió *E. tarda* en una concentración aproximada de 10^7 cel/ml en todas las muestras mientras que *T. maritimum* fue inoculado empleando diluciones decrecientes desde 10^7 hasta 10^0 cel/ml. En la otra

serie de muestras se realizó lo contrario, con altas cantidades de *T. maritimum* y diluciones de *E. tarda*. La extracción del DNA de los tejidos se realizó con InstaGene siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

Siguiendo la información aportada por Avendaño-Herrera y col. (2004) el DNA extraído de los tejidos, se sometió a una nested PCR con el fin de aumentar la sensibilidad del protocolo. Para la primera amplificación se emplearon los cebadores universales pA (5'–AGAGTTTGATCCTGGCTCAG–3') y pH (5'–AAGGAGGTGATCCAGCCGCA–3') siguiendo el protocolo previamente descrito por Edwards y col. (1989) pero empleando 25 ciclos de reacción. Tras la primera amplificación, se empleó una mezcla de 1 µl del producto de la primera amplificación más 1 µl del DNA original como molde para la segunda PCR en la que se emplearon los cebadores específicos MAR1-MAR2 y etfD.

Para todas las reacciones de m-PCR se emplearon dos termocicladores independientes: T Gradient Termocicler (Biometra, Alemania) y T Professional Basic (Biometra, Alemania). Se realizaron, además en todos los casos, controles negativos de cada reacción que consistieron en la misma mezcla descrita anteriormente pero sustituyendo el DNA por agua destilada. La reproducibilidad de los resultados se comprobó mediante la repetición de las reacciones de amplificación en 3 ensayos independientes y empleando 3 extracciones de DNA procedentes de diferentes placas de cultivo. Los productos de PCR se separaron por medio de electroforesis horizontal de la misma forma indicada con anterioridad (ver Sección 4).

b) Peces infectados experimental y naturalmente:

Como complemento a estos experimentos, se realizaron también inoculaciones de lotes de 5 rodaballos de 10-12 g de peso mediante inyección intraperitoneal. La dosis inoculada fue de 0.1 ml de una suspensión 10^4 cel/ml (10^2 cel/g de pez) de las dos cepas control. Se infectaron un total de 9 lotes: 3 lotes con la cepa ACC35.1 de *E. tarda*; 3 lotes con la cepa NCIMB2154 de *T. maritimum* y 3 lotes con ambas cepas simultáneamente. Además, como control negativo se inoculó un lote de peces con 0.1 ml de solución salina y se mantuvo en las mismas condiciones que los lotes infectados. Todos los lotes se mantuvieron en acuarios de 50 l a una temperatura de 17°C aproximadamente. A los 5 días post-infección, se sacrificaron los peces de cada lote y se extrajeron muestras de riñón. De cada una de estas muestras se realizó la extracción de DNA empleando el kit comercial Easy-DNA™

(Invitrogen, España). Además, y previamente a la extracción de las muestras, se realizaron análisis bacteriológicos clásicos en los peces sacrificados, para determinar la posible detección de los dos patógenos en los medios de cultivo TSA-1 y FMM.

Para determinar la aplicabilidad de este protocolo de m-PCR en campo, se analizaron un total de 30 rodaballos llegados a nuestro laboratorio y procedentes de plantas de cultivo en las que se habían producido brotes de edwardsielosis y flexibacteriosis previamente. El peso de los peces varió entre 50 y 100 g. Además, se analizó también un número similar de rodaballos, aparentemente sanos, y enviados a nuestro laboratorio para análisis rutinarios. Se tomaron muestras de riñón y se realizó la extracción de DNA empleando el kit Easy-DNA™ (Invitrogen, España).

Las reacciones de amplificación y la visualización de los productos en geles de agarosa se realizó tal y como se explica en el apartado anterior.

6.3.- RESULTADOS

6.3.1.- Evaluación de medios de cultivo:

Los resultados obtenidos en los ensayos de capacidad de crecimiento para las cepas incluías en este estudio en los cuatro medios ensayados, se muestran en la tabla 6.6. El medio ET fue el más selectivo, de hecho solamente las 13 cepas de *E. tarda* y la cepa de *E. hoshinae* fueron capaces de crecer en este medio. En los dos medios selectivos estudiados las cepas de *E. tarda* mostraron un centro negro, indicando la producción de H₂S (Figura 6.1 a y b). Sin embargo, pudieron observarse pequeñas diferencias en la morfología de las colonias de *E. tarda* en ambos medios. Mientras que en SS-agar las colonias son translúcidas, asumiendo el color del medio de cultivo, en ET aparecen claras o blanquecinas.

En el medio SS-agar, además de crecer todas las cepas pertenecientes a especies de enterobacterias, también lo hicieron, aunque a bajas diluciones, otras especies no entéricas pertenecientes al género *Vibrio* o *Aeromonas*. Con respecto a los dos medios generales empleados, el medio TSA-1 permitió el crecimiento de la mayoría de las especies evaluadas con la única excepción de las cepas de *T. maritimum*, las cuales sí crecieron en AM. Solamente la cepas de *E. ictaluri* y *E. hoshinae* fueron incapaces de crecer en AM. La eficiencia de recuperación de todas las cepas de *E. tarda* fue similar en los cuatro medios empleados. Solamente el medio AM mostró un cierto efecto estresante en esta especie, probablemente debido a la elevada cantidad de sales que presenta.

En los ensayos en los que se usaron cultivos mixtos se comprobó también que el medio ET es mucho más selectivo para *E. tarda*. De esta forma, en las placas de ET solamente se observó el crecimiento de colonias pertenecientes a esta especie. Por el contrario, en SS-agar, con la única excepción de *T. maritimum*, todas las cepas ensayadas pudieron crecer cuando se sembraron las suspensiones bacterianas sin diluir. Sin embargo, en todos los casos, *E. tarda* pudo ser diferenciada con facilidad de las otras especies gracias al centro negro de sus colonias. La figura 6.1 c y d muestra un ejemplo de uno de estos cultivos mixtos sembrado en ambos medios de cultivo selectivos.

En las placas sembradas con muestras de riñón infectadas experimentalmente se observó el crecimiento de colonias típicas de *E. tarda*, tanto en SS-agar como en ET, aunque el número total de colonias fue un logaritmo menor en SS-agar que en ET. La identificación de las colonias bacterianas, empleando test bioquímicos y aglutinación en portaobjetos frente a antisueros específicos, confirmó que todas las colonias pertenecían a la especie *E. tarda*.

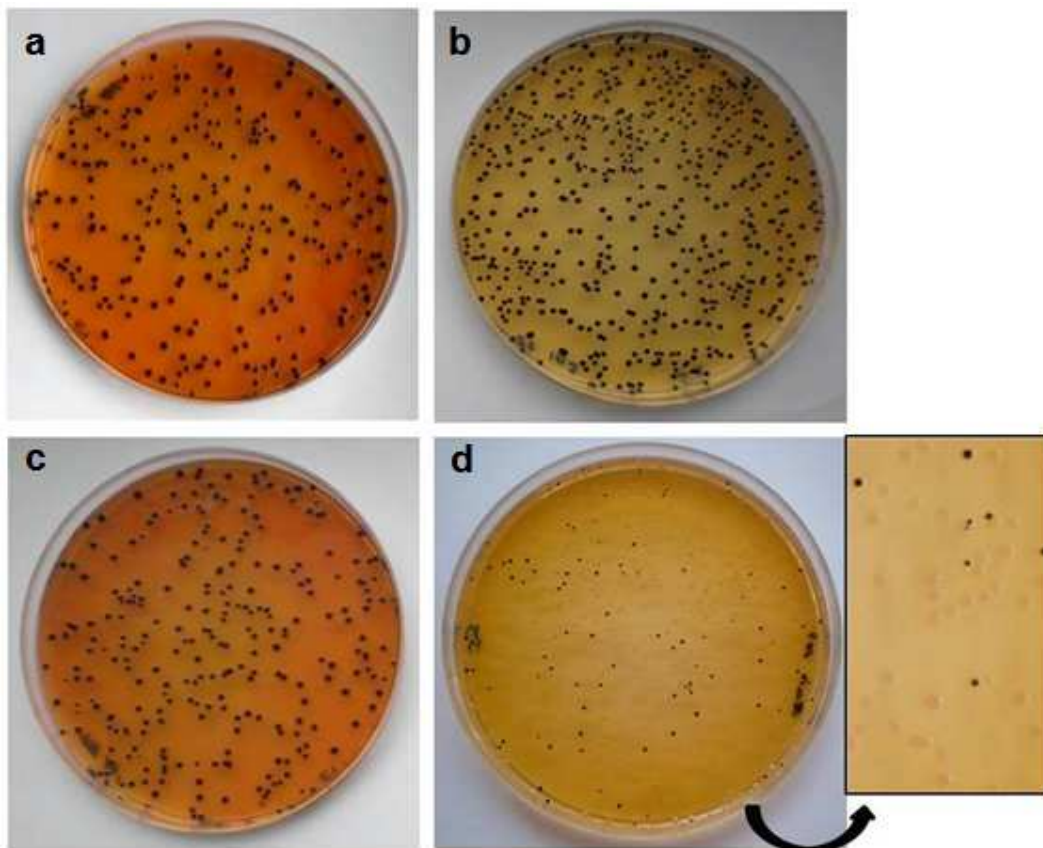


Figura 6.1.- Morfología de las colonias bacterianas para el caso de: cultivos puros de *E. tarda* en ET (a) y en SS-agar (b); cultivo mixto de *E. tarda* y *Y. ruckeri* en ET (solamente crecen colonias de *E. tarda*) (c) y en SS-agar (d). En ambos medios las colonias de *E. tarda* muestran el típico centro negro que indica la producción de H_2S .

Tabla 6.6.- Valor de la última dilución bacteriana en la que se observó crecimiento en los diferentes medios de cultivo ensayados. - : indica ausencia de crecimiento en cualquier dilución.

CEPA	ORIGEN	MEDIO DE CULTIVO			
		TSA-1	MA	SSA	ET
<i>Edwardsiella tarda</i>					
ACC35.1	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸
HL1.1	Rodaballo	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸
HL23.1	Rodaballo	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸
ACR326.1	Rodaballo	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸
RBR7.1	Rodaballo	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸
RM288.1	Rodaballo	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸
ACR419.1	Lenguado (<i>Solea senegalensis</i>)	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸
NCIMB2034	Pez (especie desconocida)	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸
CECT849.1	Humanos	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸
KGE7901	Tilapia (<i>Tilapia nilotica</i>)	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸
EDK1	Anguila (<i>Anguilla japonica</i>)	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸
FL4-53-4K	Lubina americana (<i>Morone saxatilis</i>)	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸
9.8	Lubina americana	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸
<i>Edwardsiella ictaluri</i>					
CECT885	Pez gato (<i>Ictalurus punctatus</i>)	10 ⁻⁸	-	10 ⁻⁶	-
<i>Edwardsiella hoshinae</i>					
DSM13771	Fraillecillo (<i>Fratercula arctica</i>)	10 ⁻⁸	-	10 ⁻⁸	10 ⁻⁵
<i>Escherichia coli</i>					
CECT433	Humanos	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	-
FV9180	Humanos	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	-
<i>Hafnia alvei</i>					
15/1403	Trucha (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	-
<i>Yersinia ruckeri</i>					
NCIMB1316	Trucha	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	-
1651	Trucha	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	-
SRG4.1	Trucha	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	-
<i>Vibrio anguillarum</i>					
R82 (O1)	Rodaballo	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ⁻²	-
RV22 (O2)	Rodaballo	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻²	-
RG111 (O2)	Rodaballo	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻²	-
PC725.1 (O1)	Lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻²	-
PC696.1 (O2)	Lubina	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻²	-
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>					
ACR218.1	Rodaballo	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻²	-
ACR173.1	Rodaballo	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻²	-
<i>Tenacibaculum maritimum</i>					
NCIMB2451	Red sea bream (<i>Pagrus major</i>)	-	10 ⁻⁸	-	-
PC424.1	Rodaballo	-	10 ⁻⁸	-	-
ACC13.1	Lenguado	-	10 ⁻⁸	-	-

Los cuatro medios antes mencionados, se emplearon también para analizar muestras naturales de peces con el objetivo de determinar cuál de ellos era el más indicado para la recuperación y aislamiento de *E. tarda*, así como para comprobar su posible utilidad a la hora de reducir el tiempo necesario para el diagnóstico en el laboratorio. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6.2. En todos los lotes de peces se pudo aislar *E. tarda* en los cuatro medios evaluados a partir de órganos internos y, en algunos casos, a partir de lesiones externas. Sin embargo, pudimos observar que, en aquellos casos en los que *E. tarda* se aislaba en cultivo mixto con otras especies bacterianas como puede ser el caso de bacterias oportunistas en lesiones externas (i.e. *Vibrio* sp. o *V. alginolyticus*) o bien otros patógenos bacterianos en órganos internos (i.e. *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*) solamente el medio ET fue selectivo para su aislamiento. Sin embargo, en los otros tres medios de cultivo se observó el crecimiento de cultivos mixtos de *E. tarda* y de uno o más microorganismos. Además, en algunos casos de crecimiento de cultivos mixtos, el aislamiento de *E. tarda* llegó a resultar muy difícil y laborioso, debido a la presencia de especies bacterianas con un mayor crecimiento y que resultaban predominantes en la placa.

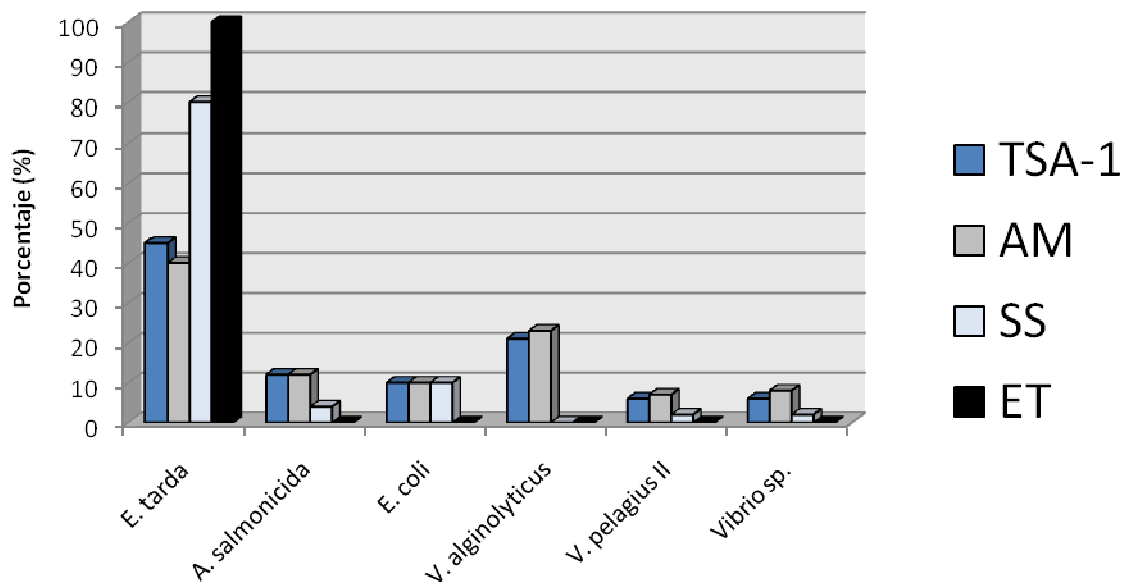


Figura 6.2.- Porcentajes de aislamientos de distintas especies bacterianas en muestras naturales de peces según el medio de cultivo empleado

6.3.2.- Evaluación y desarrollo de un protocolo de PCR para la detección de *E. tarda*:

a) Evaluación de cebadores:

Los resultados obtenidos en este apartado para las 110 cepas evaluadas pueden verse en las Tablas 6.7 y 6.8.

Cuando se empleó la pareja de cebadores *tardaF-tardaR*, solamente un 10% de las cepas en estudio produjeron el producto de amplificación esperado. Curiosamente, las cepas que dieron un resultado positivo, correspondían a aquellos aislados que procedían de especies como anguila, tilapia, platija japonesa, besugo, y la cepa de referencia CECT 849 que tiene como fuente de aislamiento heces humanas. Ninguna de las cepas de *E. tarda* aisladas de rodaballo dio un resultado positivo empleando esta pareja de cebadores. Por otra parte, se observó una amplificación inespecífica cuando se empleaba el DNA extraído de una cepa de *E. ictaluri*. Por tanto, y debido al bajo porcentaje de detección de *E. tarda* en los aislados incluidos en este estudio y a la inespecificidad observada, se decidió no realizar más estudios con esta pareja de cebadores.

En el caso de la pareja de cebadores basada en la secuencia del gen *gyrB*, no se obtuvo amplificación positiva con ninguna de las cepas empleadas.

Con respecto a las 2 parejas de cebadores (*etfA* y *etfD*), los análisis realizados nos mostraron que en ambos casos se obtenían los productos de amplificación esperados (415 y 445 pb respectivamente) para la mayoría de cepas de *E. tarda* incluidas en el estudio. De hecho, solamente 3 cepas de *E. tarda* dieron un resultado negativo para la pareja *etfA* y todas ellas produjeron un resultado positivo con la pareja *etfD*. Donde sí se encontraron mayores diferencias entre ambas parejas de cebadores, fue cuando se estudió la especificidad de la PCR. Así, mientras la pareja *etfA* producía amplificaciones inespecíficas con cepas no pertenecientes a la especie *E. tarda*, la pareja *etfD* era altamente específica (Tablas 6.7 y 6.8). Por lo tanto, y en base a estos resultados, se seleccionó la pareja de cebadores *etfD* para posteriores estudios.

Tabla 6.7.- Resultados de las reacciones de PCR para las distintas cepas de *E. tarda* incluidas en este estudio y empleando las cuatro parejas de cebadores evaluadas.

Nº CEPAS <i>E. tarda</i>	HOSPEDADOR	Cebadores			
		tardaF-tardaR	gyrBF1-gyrBR1	etfA	etfD
75	Rodaballo	0*	0	73	74
1	Dorada	0	0	0	1
2	Anguila japonesa	2	0	2	2
1	Pez gato	0	0	1	1
2	Lubina	0	0	2	2
1	Salmón del Pacífico	0	0	1	1
1	Pez ángel	0	0	0	1
2	Tilapia	2	0	2	2
2	Platija	2	0	2	2
3	Besugo	3	0	3	3
1	Pez (sin determinar)	1	0	1	1
1	Humanos	1	0	1	1

* Número de cepas detectadas con cada pareja de cebadores

La reproducibilidad de los resultados se comprobó realizando cada ensayo, al menos, tres veces de forma independiente y empleando dos termocicladores distintos no observándose diferencias entre los resultados obtenidos para cada extracción de ADN ni para cada termociclador.

Tabla 6.8.- Resultados de las reacciones de PCR empleando las cuatro parejas de cebadores analizadas y otras especies bacterianas incluidas en el estudio. +: amplificación positiva; -: amplificación negativa.

BACTERIA	Cebadores			
	tardaF- tardaR	gyrBF1 gyrBR1	etfA	etfD
<i>Edwardsiella ictaluri</i> (ATCC33202)	-	-	+	-
<i>Edwardsiella ictaluri</i> (B1.1)	+	-	-	-
<i>Edwardsiella hoshinae</i> (DSM13771)	-	-	+	-
<i>Escherichia coli</i> (CECT433)	-	-	+	-
<i>Enterobacter cloacae</i> (TW83/03)	-	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> (RPM799.1)	-	-	+	-
<i>A. salmonicida subsp. salmonicida</i> (ACR218.1)	-	-	+	-
<i>Yersinia ruckeri</i> (1651)	-	-	+	-
<i>Yersinia ruckeri</i> (SRG4.1)	-	-	+	-
<i>Hafnia alvei</i> (15/1403)	-	-	-	-
<i>Vibrio anguillarum</i> (R82)	-	-	-	-
<i>Ph.. damsela subsp.piscicida</i> (ATCC29690)	-	-	-	-
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i> (CECT899)	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (07/1139)	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CECT110)	-	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i> (PC955.1)	-	-	-	-
<i>Lactococcus garvieae</i> (SRG1.1)	-	-	-	-
<i>Streptococcus parauberis</i> (ACC33.1)	-	-	-	-

b) Determinación de la especificidad, sensibilidad y aplicación en campo del protocolo seleccionado:

- **Cultivos bacterianos puros y mixtos:**

La sensibilidad de la pareja de cebadores etfD se determinó mediante la amplificación de diferentes muestras de DNA extraído a partir de suspensiones bacterianas (desde 10^9 a 10^1 cel/ml) de la cepa ACC35.1 de *E. tarda* tanto en cultivos puros y mixtos. El producto de amplificación esperado, de 445 pb, se observó en todas las diluciones bacterianas mayores de 2×10^3 cel/ml, es decir, el límite de detección de esta pareja de cebadores para cultivos bacterianos puros de *E. tarda* resultó ser de 2 células por tubo de reacción de PCR (Figura 6.4). En el caso de los cultivos mixtos, el límite de detección resultó ser algo mayor, con valores de 200 células por tubo de reacción de PCR o, lo que es lo mismo, 2×10^5 cel/ml.

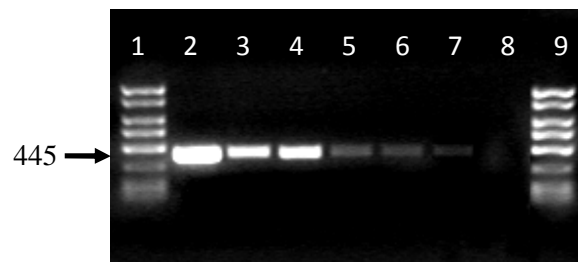


Figura 6.4.- Sensibilidad del protocolo de PCR seleccionado empleando ADN extraído a partir de cultivos bacterianos puros de la cepa ACC35.1. Líneas 1 y 9: Marcador de peso molecular AmpliSize Molecular Ruler (escala 50-2000 pb, Sigma); Líneas 2 a 8: diluciones desde 2×10^8 cel/ml (línea 2) a 2×10^2 cel/ml (línea 8). La flecha indica el producto de amplificación específico en pb.

- **Muestras de peces infectados experimentalmente:**

La aplicación del protocolo de PCR seleccionado descrito anteriormente empleando DNA extraído de muestras de tejidos de peces infectados experimentalmente con distintas diluciones de *E. tarda*, demostró que este patógeno puede ser detectado en órganos como hígado o riñón y en mucus con un límite de detección de 3×10^2 células por tubo de reacción (3×10^5 cel/g de tejido de pez o ml de mucus) (Figura 6.5). Sin embargo, cuando se emplearon muestras de sangre extraída de

peces, los límites de detección fueron considerablemente mayores (3×10^5 células por tubo de reacción o, lo que es lo mismo, 3×10^8 cel/ ml de sangre).

Por otra parte, también se estudió el límite de detección de esta pareja de cebadores, empleando muestras de peces que habían sido infectados experimentalmente vía i.p con 1 y 100 células de *E. tarda* por pez respectivamente. En este caso, se emplearon muestras de riñón, hígado, bazo, intestino, sangre y mucus. En este estudio, la detección del patógeno fue posible en todos los órganos internos incluso cuando tan sólo habían transcurrido 24 h desde la infección con la menor de las dosis administradas. Sin embargo, la detección del patógeno no fue posible a partir de las muestras de sangre y mucus. Además, en ningún caso se logró aislar la bacteria en medios de cultivo (Tabla 6.9).

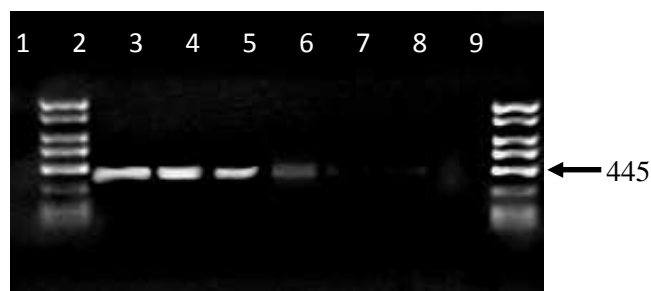


Figura 6.5.- Sensibilidad del protocolo de PCR seleccionado empleando ADN extraído a partir de muestras de riñón infectadas experimentalmente con distintas diluciones de la cepa ACC35.1. Líneas 1 y 9: Marcador de peso molecular AmpliSize Molecular Ruler (escala 50-2000 pb, Sigma); Líneas 2 a 8: diluciones desde 3×10^8 cel/ml (línea 2) a 3×10^2 cel/ml (línea 8). La flecha indica el producto de amplificación específico en pb.

Tabla 6.9.- Resultados obtenidos en los experimentos de detección de *E. tarda* en rodaballos infectados experimentalmente y de forma natural empleando el protocolo de PCR seleccionado y análisis bacteriológicos clásicos. +: detección positiva; -: detección negativa; PCR: detección mediante PCR; C: detección empleando medios de cultivo.

Muestra	Infecciones experimentales												Peces infectados de forma natural	
	Dosis inoculada													
	1 cel/pez						100 cel/pez							
	Días post-infección													
	1		2		5		1		2		5			
PCR	C	PCR	C	PCR	C	PCR	C	PCR	C	PCR	C	PCR	C	
Riñón	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
Hígado	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
Intestino	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
Bazo	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
Sangre	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Mucus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- **Muestras de peces infectados naturalmente:**

Los análisis realizados empleando muestras obtenidas a partir de peces procedentes de distintas plantas de cultivo enviados a nuestro laboratorio de diagnóstico dieron como resultado la detección de *E. tarda* a partir de órganos internos y sangre. Sin embargo, no se obtuvo ningún tipo de amplificación cuando el molde empleado fue el ADN extraído de las muestras de mucus (Tabla 6.9). Mediante análisis bacteriológico, con la excepción de las muestras de mucus, el patógeno pudo ser recuperado en cultivo a partir de sangre y órganos internos. Cuando se analizaron los peces aparentemente sanos por ambos métodos, no se obtuvo ni el aislamiento ni la amplificación por PCR de *E. tarda*.

6.3.3.- Multiplex-PCR para la detección de *E. tarda* y *T. maritimum*:

a) Especificidad y sensibilidad de la m-PCR:

Aunque en un primer momento se intentó la detección simultánea de tres importantes patógenos bacterianos para los cultivos de rodaballo y lenguado: *E. tarda*, *T. maritimum* y *Ph. damsela* subsp. *piscicida*, los resultados obtenidos en los estudios de especificidad mostraron que, a la temperatura de hibridación seleccionada (45° C) la pareja de cebadores car1-car2 (*Ph. damsela* subsp. *piscicida*) producía amplificaciones inespecíficas con varias de las cepas incluidas en el estudio. Por esta razón, decidimos emplear únicamente las parejas etfD y MAR1-MAR2 en los posteriores ensayos de m-PCR realizados.

La especificidad de la m-PCR (*E. tarda* y *T. maritimum*) se evaluó empleando el DNA extraído de un total de 61 cepas de diferentes especies bacterianas. Los resultados obtenidos en este ensayo demostraron que este protocolo de m-PCR es específico para la detección de *E. tarda* y *T. maritimum*, y todas las cepas de estas dos especies incluidas en el estudio dieron lugar a productos de PCR de los tamaños esperados (415 y 1088 pb respectivamente). Ninguna de las otras especies bacterianas ensayadas produjo productos de amplificación.

Con respecto a los valores de sensibilidad del protocolo de m-PCR para cultivos bacterianos, las concentraciones mínimas de cada patógeno que podían ser detectadas mediante m-PCR variaron cuando se emplearon cultivos puros o mixtos. Así, los límites de detección fueron de 4×10^3 y 2×10^4 cel/ml para *E. tarda* y *T. maritimum* respectivamente cuando se emplearon cultivos puros. Sin embargo, cuando la detección se realizó a partir de cultivos mixtos, *E. tarda* mantuvo el mismo límite de detección, pero la sensibilidad disminuyó ligeramente para *T. maritimum* (2×10^5 cel/ml) (Figura 6.6).

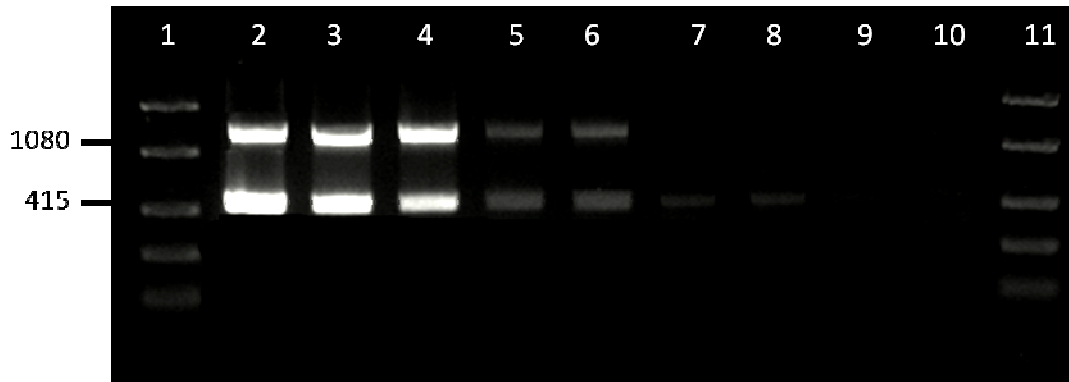


Figura 6.6.- Sensibilidad del protocolo de m-PCR empleando ADN extraído a partir de cultivos mixtos de las cepas ACC35.1 y NCIMB2154. Líneas 1 y 11: Marcador de peso molecular Fast Ruler Low Range DNA Ladder, ready-to-use (escala 50-1500 pb, Fermentas); Líneas 2 a 10: diluciones desde $4 \times 2 \times 10^9$ cel/ml (línea 2) para *E. tarda* y *T. maritimum* respectivamente, a $4 \times 2 \times 10^1$ cel/ml (línea 8). Las flechas indican los productos de amplificación específicos en pb.

Quando los límites de detección se evaluaron en muestras de riñón infectadas en el laboratorio se obtuvieron resultados similares. De esta forma, en tejidos inoculados únicamente con *E. tarda* el valor límite de detección fue de 4×10^5 cel/g de tejido, mientras que en los tejidos infectados sólo con *T. maritimum* el valor fue de 2×10^4 cel/g de tejido. Al igual que en el caso anterior, cuando a las muestras de riñón se le añadieron ambos patógenos, el límite de detección aumentó para *T. maritimum* (2×10^5 cel/g tejido) (Figura 6.7).

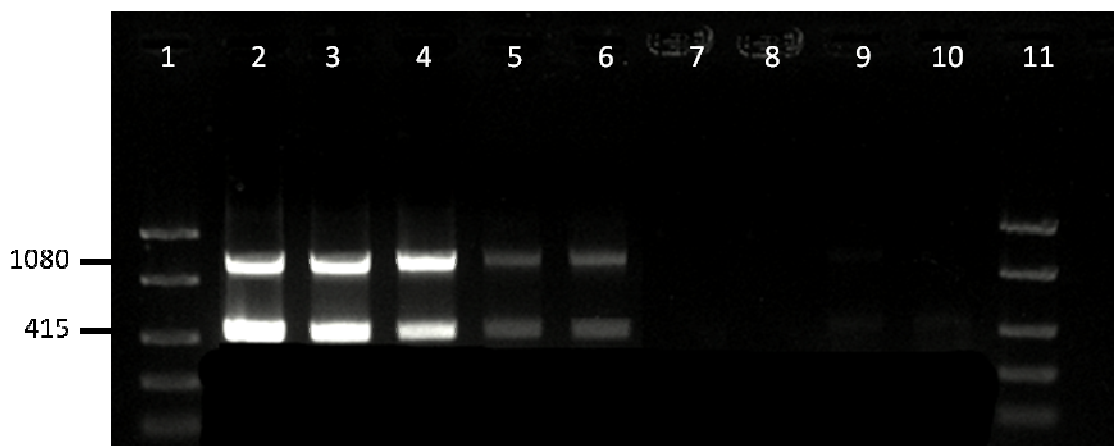


Figura 6.7.- Sensibilidad del protocolo de m-PCR empleando ADN extraído a partir de tejidos infectados simultáneamente con las cepas ACC35.1 y NCIMB2154. Líneas 1 y 11: Marcador de peso molecular Fast Ruler Low Range DNA Ladder, ready-to-use (escala 50-1500 pb, Fermentas); Líneas 2 a 10: diluciones desde $4 \times 2 \times 10^9$ cel/g (línea 2) para *E. tarda* y *T. maritimum* respectivamente, a $4 \times 2 \times 10^1$ cel/g (línea 8). Las flechas indican los productos de amplificación específicos en pb.

La coexistencia de grandes cantidades de uno de los dos patógenos con cantidades menores del otro parece no afectar a los límites de sensibilidad de la técnica, ya que los valores de detección obtenidos en este ensayo fueron similares a los descritos anteriormente.

b) Peces infectados experimental y naturalmente:

Los resultados obtenidos en los ensayos de infección de peces mostraron que esta técnica permite la detección de *E. tarda* y *T. maritimum* en peces que aún no han llegado a desarrollar la enfermedad. Ninguno de los peces sacrificados a los 5 días postinfección mostraba síntomas de infección, y la siembra en medios de cultivo de los órganos internos de los mismos dio en todos los casos resultado negativo tanto para *T. maritimum* como para *E. tarda*. Como se puede ver en la figura 6.8, el DNA extraído de los tres lotes de peces infectados solamente con *E. tarda*, produjo un producto de amplificación de 415 pb. Por su parte, los lotes infectados únicamente con *T. maritimum* mostraron el producto de amplificación esperado de 1080 pb. En los peces infectados con ambos patógenos se pudieron observar ambas bandas. El control negativo, que consistió en el DNA extraído de los riñones de los peces inoculados con PBS, no produjo ninguna banda de amplificación.

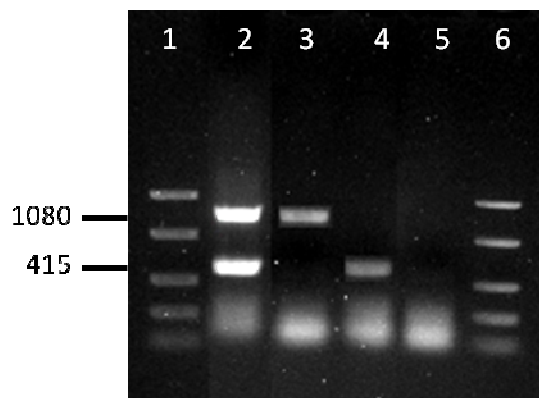


Figura 6.8.- Representación de los resultados obtenidos a partir de peces infectados experimentalmente con el protocolo de m-PCR. Líneas 1 y 11: Marcador de peso molecular Fast Ruler Low Range DNA Ladder, ready-to-use (escala 50-1500 pb, Fermentas); Línea 2: peces infectados con *E. tarda* y *T. maritimum*; Línea 3: peces infectados solamente *T. maritimum*; Línea 4: peces infectados solamente con *E. tarda*; Línea 5: control negativo. Las flechas indican los productos de amplificación específicos en pb.

Con respecto a los peces procedentes de plantas de cultivo, mientras que en los peces aparentemente sanos no se observó ningún tipo de crecimiento bacteriano en los medios de cultivo, ni ningún producto de PCR en la m-PCR, en el caso de los peces con síntomas de enfermedad, pudo detectarse la aparición de una banda de 1088 pb a partir del DNA extraído de muestras de riñón, siendo estos lotes positivos para la presencia de *T. maritimum*. Este resultado fue confirmado por el aislamiento en el medio FMM de colonias de tipo filamentoso que posteriormente fueron identificadas como *T. maritimum* por métodos bioquímicos en tubo y placa así como por PCR específica (Avendaño-Herrera y col., 2004). En estos mismos peces, no pudo detectarse la presencia de *E. tarda* ni por m-PCR ni por crecimiento en medios de cultivo.

6.4.- DISCUSIÓN

Uno de los pasos más críticos en el estudio de las enfermedades bacterianas es la correcta identificación del agente causal que permitirá la posterior toma de decisiones sobre el tratamiento de los peces, elaboración de métodos preventivos, etc...

Las mortalidades que, durante los últimos años, ha venido causando *E. tarda* especialmente en los cultivos de rodaballo de toda Europa (Castro y col., 2006; Toranzo y col., 2007), han acrecentado la necesidad del desarrollo de una técnica lo más rápida y eficaz posible para su pronto diagnóstico tanto en peces infectados como en portadores asintomáticos. Además, la posible aplicación de esta técnica a muestras ambientales podría resultar de gran importancia en futuros estudios encaminados a entender la epidemiología de *E. tarda*.

En esta sección, hemos evaluado dos medios de cultivo selectivos para el aislamiento y posterior identificación de *E. tarda*: el medio SS-agar, un medio diferencial y selectivo para el aislamiento de bacterias entéricas y el medio ET, medio selectivo diseñado (Lindquist, 1991) para el aislamiento de *E. tarda*. Además, hemos seleccionado dos medios generales de uso común en laboratorios de diagnóstico de enfermedades de peces, como son el TSA-1 (que permite el crecimiento de especies de agua dulce y marinas) y el AM (que contiene todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de bacterias marinas y que permite la recuperación de algunas especies con determinados requerimientos de crecimiento como las del género *Tenacibaculum*).

Los resultados obtenidos en los ensayos con cultivos puros y mixtos y tejidos infectados experimentalmente muestran que, en los dos medios selectivos (SS-agar y ET) *E. tarda* puede ser fácilmente diferenciada gracias a la aparición de un centro negro en sus colonias. Sin embargo, el medio ET resultó ser el más selectivo, permitiendo sólo el crecimiento de las cepas de *E. tarda* y *E. hoshinae*, aunque solamente el 0,1% de las colonias de *E. hoshinae* produjeron el centro negro. Además, la aparición de esta especie en muestras naturales es muy poco habitual y solamente existen publicados un escaso número de aislamientos, la mayoría de ellos a partir de reptiles y aves (Grimont y col., 1980).

El análisis de muestras naturales demostró que existen diferencias en el tiempo empleado en el diagnóstico de *E. tarda* según el medio empleado. Cuando se emplean medios generales o el medio selectivo SS-agar, se hace necesario el aislamiento de las colonias cuando aparecen cultivos mixtos. Esto implica un retraso en el diagnóstico de, como mínimo, 24 h. Por el contrario, cuando se emplea el medio ET, se obtienen cultivos puros de *E. tarda* que permiten su uso directo para una identificación confirmativa.

En resumen, proponemos el medio ET como el más apropiado para llevar a cabo estudios epidemiológicos de la edwardsielosis en acuicultura ya que permite la recuperación de *E. tarda* y evita el crecimiento de especies no deseadas. Además, el uso de este medio en paralelo con otros medios generales como TSA-1 o AM en laboratorios de diagnóstico de enfermedades de peces, podría contribuir a una diagnosis más rápida de esta importante enfermedad.

A pesar de los buenos resultados que generalmente han dado los métodos clásicos para la detección y diagnóstico de la edwardsielosis en peces, existen ocasiones en que se hace necesario el aumento de la rapidez y sensibilidad del diagnóstico. En casos de infecciones agudas en plantas de cultivos, *E. tarda* ha llegado a causar elevadas mortalidades en un período de tiempo muy corto. Por ello, la detección precoz del patógeno se hace vital para la viabilidad de las poblaciones de cultivo.

En el presente trabajo, hemos evaluado en paralelo la especificidad de la pareja de cebadores de Chen y Lai (1998) (*tardaF* y *tardaR*), la de dos parejas de las cuatro diseñadas por Sakai y col. (2007) (*etfA* y *etfD*) y los cebadores publicados por Lan y col. (2008) *gyrBF1-gyrBR1*, con el objetivo de proponer un protocolo eficaz para la detección de *E. tarda*. Para ello, empleamos una amplia colección de cepas de *E. tarda* con diferentes orígenes geográficos y de hospedador, así como otras especies bacterianas. Los resultados obtenidos demostraron que solamente la pareja de cebadores *etfD* fue específica para la detección del patógeno. La ausencia de resultados positivos para todas las cepas estudiadas cuando empleamos la pareja de cebadores diseñada por Lan y col., nos resultó sorprendente. Este resultado podría ser explicado por el hecho de que las secuencias de los cebadores *gyrBF1* y *gyrBR1* presentan 4 y 2 discordancias (mismatches) respectivamente, con respecto a la secuencia del gen *gyrB* depositada en el GenBank (cepa NCIMB2034, Genbank Acc. nº. EU259314.1). Todas estas discordancias (mismatches) en conjunto serían suficientes como para

evitar que se produjese amplificación en el gen *gyrB* de las cepas de *E. tarda* cuyas secuencias difirieran de la de la cepa LTB-4 sobre la que fueron diseñados los cebadores.

Cuando se calculó la sensibilidad de este protocolo, se obtuvieron valores de 2, 200 y 300 cel/tubo reacción para cultivos puros, mixtos y tejidos y mucus infectados de forma experimental, respectivamente, los cuales se encuentran dentro del mismo rango que los descritos ya anteriormente para otros patógenos bacterianos (Osorio y col, 1999; Avendaño-Herrera y col., 2004; Romalde y col., 2004). Sin embargo, en sangre, el límite de detección obtenido resultó ser mayor (3×10^5 cel/tubo de reacción), por lo que la aplicación de este protocolo para la detección de portadores en análisis no destructivos no sería adecuada.

Las inoculaciones experimentales demostraron que es posible detectar el patógeno mediante este protocolo de PCR a partir de órganos internos de los peces pero no a partir de mucus o sangre. Basándonos en este hecho, proponemos el riñón como el órgano diana para el diagnóstico de la enfermedad en peces portadores de *E. tarda*. El hecho de que en estos ensayos, no pudiésemos detectar la bacteria en medios de cultivo convencionales, podría explicarse por el escaso período de tiempo que duraron los experimentos (5 días). De hecho, en otros estudios realizados por nuestro grupo hemos comprobado que en peces inoculados experimentalmente con *E. tarda* (con dosis menores de 10^4 CFU/ml) las mortalidades comienzan a partir del día 12 tras la inoculación (Castro y col., 2011b).

Por otra parte, los resultados obtenidos cuando se emplearon peces naturalmente infectados con *E. tarda* demostraron que este protocolo permite la detección del patógeno a partir de todas las muestras estudiadas (riñón, hígado, bazo, intestino y sangre), pero no del mucus. Este resultado negativo podría ser explicado por estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio que demostraron la actividad antibacteriana del mucus de rodaballo contra *E. tarda* (“datos no mostrados”).

Por lo tanto, proponemos este protocolo de PCR basado en la pareja de cebadores etfD (Sakai y col., 2007), como un método de rutina rápido, eficaz y sensible para el diagnóstico de la edwardsielosis en peces infectados.

En los últimos años, algunas de las enfermedades que han causado más pérdidas en los cultivos de rodaballo y lenguado ha sido las causadas por las especies bacterianas *E. tarda*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* y *T. maritimum*. Aunque los protocolos de detección por PCR de estos patógenos han sido publicados y parecen dar buenos resultados (Castro y col., 2010; Osorio y col., 2000b; Avendaño-Herrera y col., 2004), el desarrollo de un protocolo de multiplex PCR permitiría la detección simultánea de estas especies bacterianas disminuyendo el coste económico y de mano de obra del proceso.

En el año 2009 Chang y col. publicaron un trabajo en donde se desarrollaba un protocolo de m-PCR para la detección simultánea de cuatro patógenos bacterianos de importancia para la acuicultura de Asia subtropical, entre los que se encontraba *E. tarda*, y en el que empleaban parejas de cebadores diseñadas a partir de la secuencia de la subunidad 16S del ARN ribosómico. Sin embargo, la aplicación de esta secuencia para la detección de *E. tarda* no sería aconsejable ya que está altamente conservada (Castro y col., 2010) y presenta unos porcentajes de homología en el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, National Center for Biotechnology Information) que varían entre el 96 y el 100% con otras especies bacterianas, tanto de su mismo género como *E. ictaluri* o *E. hoshinae*, como de otros géneros como *Pseudomonas fluorescens* o *Serratia marcescens*. En la colección de cepas que Chang y col. emplearon para ensayar la especificidad de su protocolo de m-PCR, no incluía ningún aislado perteneciente a alguna de estas cuatro especies.

La m-PCR evaluada en este trabajo resultó específica para *E. tarda* y *T. maritimum*, pero no para *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Estos resultados estarían de acuerdo con los publicados anteriormente por Osorio y col. (1999) en donde recomendaban una temperatura de hibridación para la PCR específica de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* de 65°C describiendo la aparición de amplificaciones inespecíficas en las reacciones realizadas a 60° y 55°C. Por esta razón, se realizaron los experimentos siguientes únicamente con *E. tarda* y *T. maritimum*. Los límites de detección obtenidos para esta m-PCR se encuentran dentro de los rangos descritos para otros protocolos de m-PCR y aumentaron para el caso de *T. maritimum* cuando ambas especies se detectaban por separado, lo que parece indicar que podría existir cierta competencia entre ambas. A pesar de ello, los valores de los límites de detección obtenidos resultan lo suficientemente bajos como para garantizar una buena sensibilidad en la detección de los patógenos. Además, la utilidad de

esta técnica se demostró también en peces infectados natural y artificialmente, permitiendo, la detección de los patógenos que estaban causando la infección.

La rapidez, sencillez, sensibilidad y especificidad de esta técnica de m-PCR, así como la importancia de los patógenos diana para los que ha sido diseñada, hacen de ella una técnica de gran utilidad e importancia para la detección temprana de *T. maritimum* y *E. tarda* en los cultivos de rodaballo.

Evaluation of four polymerase chain reaction primer pairs for the detection of *Edwardsiella tarda* in turbot

N. Castro*, A. E. Toranzo, S. Núñez, C. R. Osorio, B. Magariños

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Biología/CIBUS e Instituto de Acuicultura, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

ABSTRACT: *Edwardsiella tarda* is an important emergent pathogen in European aquaculture, causing several mortality events in turbot *Scophthalmus maximus* cultures in recent years. Here, we evaluated in parallel the specificity of 4 previously published pairs of primers, gyrBF1/gyrBR1, tardaF/tardaR, etfA and etfD, for the detection of 53 *E. tarda* strains isolated from different sources, as well as 18 representatives of related and unrelated bacterial species. On the basis of the obtained results, we selected the pair of primers etfD, because it was the only one that recognized all *E. tarda* strains without false positive reactions. The sensitivity of this primer set showed detection limits of 2 cells per reaction tube in the case of pure cultures and 200 cells per reaction tube in mixed cultures. With regard to the sensitivity in seeded turbot tissues (kidney, liver and mucus), the detection limit was 3×10^2 *E. tarda* cells per reaction. In experimentally infected turbot, the etfD primer set was able to detect the pathogen in internal organs even 1 d post-infection, with a dose of 0.1 cells g^{-1} of fish. In addition, this polymerase chain reaction protocol was useful for the detection of *E. tarda* in the field, and, based on the findings, we propose it as the most appropriate for accurate detection of *E. tarda* in routine diagnosis of edwardsiellosis in fish.

KEY WORDS: *Edwardsiella tarda* · PCR · Detection · Diagnosis · Turbot

—Resale or republication not permitted without written consent of the publisher—

INTRODUCTION

Edwardsiella tarda is a gram-negative bacterium, a member of the family *Enterobacteriaceae* and an important pathogen causing enterohaemorrhagic septicemic disease in a variety of organisms, including amphibians, reptiles, fish, marine mammals and humans. This disease, also called edwardsiellosis, is a serious systemic bacterial disease that has a worldwide distribution in fresh and marine water, causing mortalities in important aquaculture species such as eel *Anguilla japonica*, flounder *Paralichthys olivaceus* and catfish *Ictalurus punctatus*, among others (Sakazaki & Tamura 1992, Plumb 1999).

In recent years, repeated outbreaks of edwardsiellosis have been detected in several turbot *Scophthalmus maximus* cultures in Europe, causing important

economic losses (Castro et al. 2006, Toranzo 2007, Castro 2008). Although classical bacteriological and serological analyses give accurate and effective identification, rapid, specific and sensitive detection techniques that allow diagnosis of edwardsiellosis could represent an important advance in the prevention of the disease.

The polymerase chain reaction (PCR) is a DNA-based method that is used for the detection of many marine pathogens (Osorio & Toranzo 2002, Toranzo et al. 2004). Although in many PCR protocols the primers employed have been designed using the 16S ribosomal RNA (rRNA) gene as a target, the application of the 16S rRNA sequence is not always advisable, since it is highly conserved. In fact, in the case of *Edwardsiella tarda*, its 16S sequence shares identity of 96 to 100 % in BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, National Center for Biotechnology Information) with other

*Email: nuria.castro@usc.es

species of the same genus, such as *E. ictaluri* and *E. hoshinae*, or with species of different genera, such as *Pseudomonas fluorescens* and *Serratia marcescens*.

In 1998, Chen and Lai designed a pair of primers that used the haemolysin gene as a target to detect *Edwardsiella tarda*, generating an 1109 bp product in the open reading frame (ORF) II and III regions (Chen & Lai 1998). Several *E. tarda* strains were employed, most of which were isolated from infected eels and from experimentally infected tilapia and water. In 2007, Sakai et al. developed 4 primer sets (etfA, etfB, etfC and etfD) targeting the Type 1 fimbrial gene cluster of *E. tarda* to determine the presence of such fimbrial genes among the fish pathogenic and non-pathogenic strains of this bacterium isolated from Japanese fish (Sakai et al. 2007). Only 2 primer sets (etfA and etfD) showed an ability to detect *E. tarda*. Recently, Lan et al. (2008), designed a set of primers (gyrBF1 and gyrBR1) based on the sequence of the divergent region of the partial *gyrB* gene of an unusual *E. tarda* strain isolated from turbot in China. This set of primers generated a specific PCR product of 415 bp.

However, these pairs of primers have not yet been tested simultaneously in order to compare their specificity using a wide range of strains isolated from different hosts and geographical origins. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the specificity and sensitivity of the 3 PCR methods described previously, in order to identify the best protocol for the detection of *Edwardsiella tarda* in fish, with special emphasis on the diagnosis of turbot edwardsiellosis.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. The bacterial strains used in the primer specificity studies are listed in Table 1. This collection comprises 36 *Edwardsiella tarda* isolates from turbot in different outbreaks from 2004 to 2008, 17 *E. tarda* strains from other sources, as well as 18 isolates of other enterobacteria and marine fish pathogens (Table 1).

Strains were routinely cultured on Trypticase Soy Agar supplemented with 1% of NaCl (TSA-1; Pronadisa) and incubated at 25 or 37°C, depending on the strain, for 24 h. Before the assays, all bacterial strains were confirmed employing biochemical and serological tests (Thoesen 1994, Castro et al. 2006). Stock cultures were stored at -70°C in Cryo-Bille tubes (AES Laboratory).

DNA extraction from bacterial cultures. Chromosomal DNA was extracted employing Insta-Gene Matrix (Bio-Rad) from bacterial cultures, following the recommendations of Bio-Rad, and eluted in a final volume of 200 µl of Insta-Gene Matrix. All DNA concentrations

were examined at 260 nm and adjusted to between 10 and 20 ng µl⁻¹. DNA was maintained at -30°C until used for PCR reactions. All the experiments were carried out with DNA obtained in 3 different extractions for each bacterial strain.

DNA amplification. All PCR amplifications were performed employing commercial Ready-To-Go PCR beads (Amersham Pharmacia Biotech), which included all the reagents needed for the PCR reactions with the exception of the specific primers and DNA template. Four species-specific primer pairs described by Chen & Lai (1998), Sakai et al. (2007) and Lan et al. (2008) were synthesized by Sigma-Genosys and employed in this work for the identification of *Edwardsiella tarda* (see Table 2).

One microlitre of each DNA solution and 1 µl of each primer (100 µM) were used in the amplification reactions. Reaction mixtures (25 µl) were amplified in 2 different thermal cyclers: the T Gradient Termocicler (Biometra) and the T Professional Basic (Biometra). The amplification cycles used for denaturation, primer annealing to the template and primer extension were carried out according to each published protocol. Negative controls, consisting of the same reaction mixture but with sterile distilled water instead of template DNA, were included in each batch of PCR reaction. The reproducibility of the results was assessed by repetition of the amplifications in 3 independent PCR assays.

In addition, as a positive control, the universal primers pA (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') and pH (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3') (Edwards et al. 1989) were employed to detect the 16S rDNA in all strains.

Analysis of PCR products. Amplified products were detected by horizontal 1% (w/v) agarose gel electrophoresis for 60 min at 100 V in TAE (Tris-acetate-EDTA) 1× (0.04 M Tris, 1 mM EDTA [ethylenediaminetetraacetic acid], pH 8.0) electrophoresis buffer, visualized using 0.06 µg ml⁻¹ of ethidium bromide (Bio-Rad), photographed under UV light and computer digitised (Gel Doc 100, Bio-Rad). A 50 to 2000 bp ladder (Sigma Chemical Co.) was used as a molecular mass marker. The presence of a single product of the appropriate size was considered as a positive result.

Sensitivity of the PCR. On the basis of the obtained results comparing the ability of each primer pair tested to amplify *Edwardsiella tarda* from all sources, we selected the primer pair etfD and evaluated its sensitivity with respect to *E. tarda* detection. The detection limit of this primer set was evaluated employing pure *E. tarda* and *E. tarda* cultures mixed with other fish pathogens.

From pure cultures of 3 selected *Edwardsiella tarda* strains (2 turbot isolates and NCIMB2034), colonies were picked from TSA-1 plates, visually adjusted to

Table 1. Bacterial strains included in the present study, and the results from the specific polymerase chain reaction detection methods employed. Primer sets show number of strains detected with each primer set. NCIMB: National Collection of Marine and Industrial Bacteria (Aberdeen, UK); CECT: Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, Spain); ATCC: American Type Culture Collection (Rockville, USA); DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (Braunschweig, Germany)

Strain	Source	No. of strains	Primer sets			
			gyrBF1/gyrBR1	tardaF/tardaR	etfA	etfD
<i>Edwardsiella tarda</i> strains						
Turbot	<i>Scophthalmus maximus</i>	36	0	0	35	36
Gilthead seabream	<i>Sparus aurata</i>	1	0	0	0	1
Japanese eel	<i>Anguilla japonica</i>	2	0	2	2	2
Catfish	<i>Ictalurus punctatus</i>	1	0	0	1	1
Striped bass	<i>Morone saxatilis</i>	2	0	0	2	2
Pacific salmon	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	1	0	0	0	1
Angel fish	<i>Pterophyllum scalare</i>	1	0	0	0	1
Tilapia	<i>Oreochromis niloticus</i>	2	0	2	2	2
Japanese flounder	<i>Paralichthys olivaceus</i>	2	0	2	2	2
Red seabream	<i>Pagrus major</i>	3	0	3	3	3
<i>E. tarda</i> NCIMB2034	Unknown fish	1	0	1	1	1
<i>E. tarda</i> CECT849	Human faeces	1	0	1	1	1
Other bacterial strains						
<i>Edwardsiella ictaluri</i> ATCC33202	<i>Ictalurus punctatus</i>	1	0	0	1	0
<i>Edwardsiella ictaluri</i> B1.1	<i>Chondrostoma polylepis</i>	1	0	1	0	0
<i>Edwardsiella hoshinae</i> DSM13771	<i>Fratercula</i> sp.	1	0	0	1	0
<i>Escherichia coli</i> CECT433	Human	1	0	0	1	0
<i>Enterobacter cloacae</i> TW83/03	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	1	0	0	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i> RPM799.1	<i>Scophthalmus maximus</i>	1	0	0	1	0
<i>Yersinia ruckeri</i> 1651	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	1	0	0	1	0
<i>Yersinia ruckeri</i> SRG4.1	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	1	0	0	1	0
<i>Hafnia alvei</i> 15/1403	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	1	0	0	0	0
<i>Serratia marcescens</i> PC955.1	<i>Scophthalmus maximus</i>	1	0	0	0	0
<i>Aeromonas salmonicida</i> ssp. <i>salmonicida</i> ACR218.1	<i>Scophthalmus maximus</i>	1	0	0	1	0
<i>Listonella (Vibrio) anguillarum</i> R82	<i>Scophthalmus maximus</i>	1	0	0	0	0
<i>Photobacterium damsela</i> ssp. <i>piscicida</i> ATCC29690	<i>Seriola quinqueradiata</i>	1	0	0	0	0
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i> CECT899	<i>Anguilla japonica</i>	1	0	0	0	0
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 07/1139	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	1	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CECT110	Unknown	1	0	0	0	0
<i>Lactococcus garvieae</i> SRG1.1	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	1	0	0	0	0
<i>Streptococcus parauberis</i> ACC33.1	<i>Scophthalmus maximus</i>	1	0	0	0	0

Table 2. Primer sets employed in the present study for the detection of *Edwardsiella tarda*

Primer set	Positions (encoding protein)	Target gene	Predicted product size (bp)	Source
tardaF/tardaR				
5'-CCT TAT AAA TTA CTC GCT-3'	744–761	ORFII–ORFIII (haemolysin)	1109	Chen & Lai (1998)
5'-TTT GTG GAG TAA CAG TTT-3'	1850–1833			
etfA				
5'-CGG TAA AGT TGA GTT TAC GGG TG-3'	2160–2182	etfA (major fimbrial subunit)	415	Sakai et al. (2007)
5'-TGT AAC CGT GTT GGC GTA AG-3'	2555–2574			
etfD				
5'-GGT AAC CTG ATT TGG CGT TC-3'	6171–6190	etfD (fimbrial subunit)	445	Sakai et al. (2007)
5'-GGA TCA CCT GGA TCT TAT CC-3'	6596–6615			
gyrBF1/gyrBR1				
5'-GCA TGG AGA CCT TCA GCA AT-3'	242–262	gyrB (gyrase)	415	Lan et al. (2008)
5'-GCG GAG ATT TTG CTC TTC TT-3'	637–656			

contain 10^9 cells ml^{-1} (corresponding to McFarland Scale 4) and serially diluted in 0.85% sterile saline solution (SS) from 10^8 to 10 cells ml^{-1} .

To determine the usefulness of the *etfD* primers to amplify template *Edwardsiella tarda* DNA from mixed cultures, bacterial suspensions of *Listonella (Vibrio) anguillarum* (R82) and *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* (ACR218.1) were employed. We selected these bacterial species because both are some of the most common and important pathogens in turbot aquaculture. Bacterial mixtures simultaneously including these 2 pathogens and *E. tarda* (turbot strain ACC35.1) were prepared by mixing 500 μl of each bacterial suspension, previously adjusted at a concentration of 10^7 cells ml^{-1} , and were serially diluted. All dilutions were centrifuged at 12 000 rpm for 2 min and washed twice with sterile distilled water. Extraction and amplification of genomic DNA, as well as the analysis of the PCR products, were performed as described before. Colony-forming units (CFU) were estimated by plating each dilution onto TSA-1 plates and counting the produced bacterial colonies.

Applicability to fish tissues. To determine the applicability of the *etfD* primer set in the detection of *Edwardsiella tarda* in fish tissues, different samples including kidney, liver, intestine, blood and mucus were obtained from healthy turbot (10 to 12 g weight), which were analysed by bacteriological standard methods (Thoesen 1994) to confirm the absence of pathogens that could interfere in the experiments. Samples of 1 g of each tissue (liver and kidney) were then homogenized respectively in 100 μl of phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) by repeated pipetting. In the case of blood and mucus, the volume employed was 200 μl . Each fish sample was seeded with 100 μl of the different dilutions of the *E. tarda* turbot strain ACC35.1 and homogenized. After incubation for 1 h at 25°C, DNA extraction was performed with the Easy-DNA kit for genomic DNA isolation (Invitrogen) following the manufacturer's recommendations. DNA was maintained at -30°C until use in PCR reactions. DNA from non-seeded fish samples, and PBS were extracted in the same manner for use as negative controls.

In addition, tissues from 2 batches of 50 turbot (10 to 12 g weight) injected with *Edwardsiella tarda* strain ACC35.1 at a concentration of 0.1 ml of 10^2 CFU ml^{-1} (1 CFU g^{-1} of fish) and 10 CFU ml^{-1} (0.1 CFU g^{-1} of fish), respectively, were used to test the *etfD* PCR assay. The *E. tarda* strain employed in these challenges was again the isolate ACC35.1, with a LD_{50} of 1.6×10^1 cells ml^{-1} (Toranzo 2007). For the control group, the same number of fish were injected with 0.1 ml of SS and maintained at the same conditions as infected fish. Fish were maintained in 50 l aquaria with continuous aeration and water temperature of approximately

17°C. Samples of kidney, liver, spleen, intestine, blood and mucus were collected from 10 turbot before inoculation and at 1, 2 and 5 d post-inoculation, and pools of each tissue type were prepared per time point. DNA was extracted with the Easy-DNA kit for genomic DNA isolation (Invitrogen) and eluted in a final volume of 100 μl of TE buffer. Then, 1 μl of DNA was employed as template in the PCR assay. Classical bacteriological analysis, by standard plate culture techniques and further biochemical and serological identification, was performed in order to assess the ability to detect *E. tarda* by this method in the challenged fish.

Field validation. A total of 80 diseased turbot ranging from 50 to 200 g coming from natural outbreaks in 3 different rearing facilities, as well as a similar number of apparently healthy fish sent to our laboratory for routine analysis, were tested using the *etfD* PCR assay. Tissue samples (kidney, spleen, liver and intestine), as well as blood and mucus, were analysed. Conditions for DNA extraction and PCR amplification were the same as described above. In parallel, classical bacteriological analyses were performed in order to confirm the presence or absence of *Edwardsiella tarda*.

RESULTS

PCR specificity

To test the specificity of each pair of primers for *Edwardsiella tarda* identification, DNA extracted from a collection of 71 strains, including *E. tarda* and non-*E. tarda* isolates were used in PCR reactions with each primer pair (Table 1). When the primers *tardaF/tardaR* were employed, the expected amplification product was obtained in only 21% of the strains used in the present study. In fact, only strains isolated from Japanese eel and flounder, tilapia, red seabream and the reference strain CECT 849 from human faeces generated the 1109 bp PCR-fragment, and no isolate from turbot *Scophthalmus maximus* showed the expected amplification product. Moreover, non-specific amplification was observed with DNA template from *E. ictaluri*. With regard to the primers *etfA*, the expected 415 bp band was not amplified in 4 *E. tarda* strains isolated from turbot, gilthead seabream, Pacific salmon and angel fish. In addition, these *etfA* primers produced non-specific amplification with non-*E. tarda* strains. PCR amplification with the set of primers *gyrBF1/gyrBR1* did not yield PCR products in any of the strains tested. In contrast to the other 3 PCR primer pairs tested, the primer set *etfD* identified all the *E. tarda* isolates, and no cross-amplification with other bacterial species was detected. Based on these results, only the primer pair *etfD* was selected for subsequent studies.

Reproducibility of PCR was demonstrated, since the same results were obtained in, at least, 3 independent PCR assays for each primer set tested and using 2 different thermal cyclers. As expected, the universal primers pA/pH yielded a PCR product of the predicted size (1501 bp) in all strains tested (data not shown).

Determination of PCR sensitivity from pure and mixed cultures

The sensitivity of the etfD primer pair was determined by amplification of the DNA extracted from different bacterial suspensions (10^8 to 10 CFU ml^{-1}) of *Edwardsiella tarda* strains in pure and mixed cultures. The expected 445 bp PCR product was obtained with samples containing as low as 2 cells per PCR reaction tube ($2 \times 10^3 \pm 0.2$ CFU ml^{-1}) in the case of pure cultures (Fig. 1a) and 200 cells per PCR reaction tube ($2 \times 10^5 \pm 0.2$ CFU ml^{-1}) in the case of mixed cultures (Fig. 1b).

Determination of PCR sensitivity from seeded tissues and experimentally infected fishes

The application of the etfD PCR protocol to DNA templates obtained from fish tissues seeded with different concentrations of *Edwardsiella tarda* showed that this pathogen can be detected in kidney, liver and mucus at a detection level of 3×10^2 CFU per reaction tube (3×10^5 CFU g^{-1} fish tissue or ml^{-1} of mucus) (Fig. 1c). When blood was employed, the detection limit was 3×10^5 CFU per tube of reaction (3×10^8 CFU ml^{-1} of blood).

The PCR assay was also applied to kidney, liver, spleen, intestine, blood and mucus samples obtained from experimentally inoculated turbot with doses of 1 and 10 CFU fish^{-1} . *Edwardsiella tarda* was detected by PCR from the internal organs of all infected fish, even 1 d post-inoculation and with the lower concentration

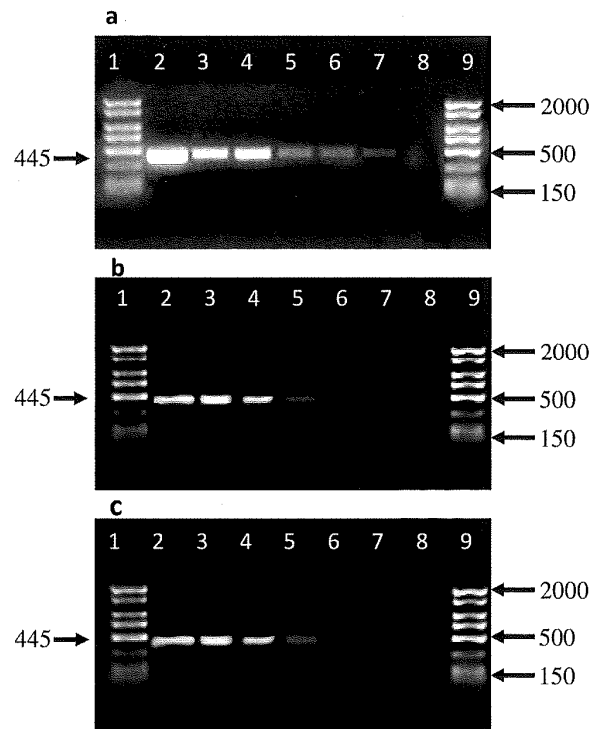


Fig. 1. Sensitivity of the polymerase chain reaction protocol using purified DNA from serial dilutions of (a) a pure culture of *Edwardsiella tarda* strain ACC35.1, (b) mixed cultures and (c) from seeded samples of kidney. Lanes 1 and 9: AmpliSize Molecular Ruler (50 to 2000 bp ladder; Sigma); (a,b) Lanes 2 to 8: dilutions ranging from 2×10^8 CFU (colony-forming units) ml^{-1} (Lane 2) to 2×10^2 CFU ml^{-1} (Lane 8). (c) Lanes 2 to 8: dilutions ranging from 3×10^8 CFU ml^{-1} (Lane 2) to 3×10^2 CFU ml^{-1} (Lane 8). Numbers on the left indicate the specific amplified product in basepairs

of bacteria inoculated, but not from blood or mucus (Table 3). No amplification was observed in tissues from the PBS-inoculated fish used as negative controls.

Table 3. Detection of *Edwardsiella tarda* in experimentally inoculated (at doses of 1 and 100 colony-forming units [CFU] fish^{-1}) and in naturally infected turbot by polymerase chain reaction (PCR) and by classical bacteriological analysis using standard culture methods (C) (+: positive detection; -: negative detection; dpi: days post-infection). All apparently healthy fishes showed negative results for PCR amplification and classical bacteriological analysis

Samples	Experimental infection												Naturally infected samples PCR C	
	1 CFU fish^{-1}						10 CFU fish^{-1}							
	1 dpi		2 dpi		5 dpi		1 dpi		2 dpi		5 dpi			
PCR	C	PCR	C	PCR	C	PCR	C	PCR	C	PCR	C	PCR	C	
Kidney	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
Liver	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
Intestine	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
Spleen	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
Blood	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Mucus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

By classical bacteriological analysis, *E. tarda* colonies were not detected on agar plates when samples from internal organs, blood and mucus were plated.

Field validation

In the case of the samples obtained from naturally infected turbot coming from 3 different rearing facilities, *Edwardsiella tarda* was detected in all internal organs and blood, producing the specific *etfD* PCR product (445 bp). However, no amplification was observed when the mucus samples of these fish were employed (Table 3). In all cases of infected fish, *E. tarda* was isolated on TSA-1 plates using homogenates from all internal organs and blood, but not from mucus, and was identified by biochemical and serological tests. Neither isolation of the pathogen, nor PCR amplification occurred when the apparently healthy turbot were analysed. The total time for the PCR procedure, including DNA extraction from samples, amplification and gel electrophoresis, was shorter than 6 h.

DISCUSSION

Edwardsiella tarda is an important emerging bacterial pathogen in turbot *Scophthalmus maximus* culture causing high and rapid mortalities in this fish species (Castro et al. 2006, Toranzo 2007). Therefore, there is an urgent need to develop a sensitive and accurate method for the fast detection of this bacterium, in both infected and carrier fish. Moreover, the application of this technique to environmental samples could be of great importance to determine reservoirs of *E. tarda*.

DNA-based methods have been developed in recent years for the fast and sensitive diagnosis of pathogens of many aquatic species (Toranzo et al. 2005). In the present study, we evaluated in parallel the effectiveness of the primers *tardaF* and *tardaR* from Chen & Lai (1998), 2 selected sets of primers (*etfA* and *etfD*) from Sakai et al. (2007) and the pair of primers *gyrBF1/gyrBR1* from Lan et al. (2008) in order to assess the best PCR protocol to identify and detect *Edwardsiella tarda* from both pure and mixed cultures, as well as in fish and environmental samples. For this, we employed a collection of *E. tarda* strains with a wide range of host and geographical origins, as well as a collection of related and unrelated bacterial isolates. The obtained results demonstrated that only the primer pair *etfD* was specific for *E. tarda* detection. The lack of amplification in all strains employed in the present study when the primers *gyrBF1* and *gyrBR1* were used is explained by the fact that the sequences of these primers, published by Lan et al. (2008), show 4 and 2

mismatches, respectively, with the *gyrB* sequence reported for *E. tarda* NCIMB2034 (GenBank accession number EU259314.1). These mismatches together would be enough to prevent amplification of the *gyrB* gene in *E. tarda* strains whose sequence differs from that of the unusual strain LTB-4.

Sensitivity for the primer set *etfD* was about 2 and 200 CFU per tube of reaction in the case of pure and mixed cultures, respectively, and 300 CFU in seeded tissues and mucus. The sensitivity obtained for the *etfD* PCR assay for *Edwardsiella tarda* is comparable to those obtained for other bacterial fish pathogens (Osorio et al. 1999, Romalde et al. 2004, Avendaño-Herrera et al. 2004). However, the detection limit in blood was in the order of 3×10^5 CFU per tube of reaction, which could be considered a poor value for its applicability as a non-destructive diagnostic procedure for the detection of carrier fish of *E. tarda*.

In addition, when experimental infection of turbot was developed, we could detect *Edwardsiella tarda* by PCR from the internal organs of inoculated fish, but not from the mucus or blood. Based on this, we propose the kidney as a target organ for the detection of carrier animals of *E. tarda*. The failure to detect the bacterium by conventional microbiological culture could be due to the period of study (5 d). In fact, we have previously demonstrated that mortalities caused by *E. tarda* in turbot inoculated with doses $<10^4$ CFU ml⁻¹ start on Day 12 post-inoculation (Toranzo 2007).

On the other hand, the analysis of naturally infected turbot received in our laboratory showed that, when the infection is already present in fish, PCR and bacteriological protocols allow the detection of *Edwardsiella tarda* from all samples tested except mucus. The negative PCR detection in this type of sample could be explained by recent studies in our laboratory in which the antibacterial activity of mucus against *E. tarda* was demonstrated (data not shown).

In summary, we propose the PCR protocol employing the primer set *etfD* (Sakai et al. 2007) as a rapid and sensitive method for the accurate detection of *Edwardsiella tarda* in infected fish.

Acknowledgements. This work was supported in part by Grants 08MMA018E and AGL2009-08859 from Xunta de Galicia and Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain), respectively. The authors thank Insuñía SL for the kind supply of fish for the experimental assays, as well as the different donors of the strains used in this work. N. Castro also thanks the Universidad de Santiago de Compostela (Spain) for a predoctoral fellowship.

LITERATURE CITED

Avendaño-Herrera R, Magariños B, Toranzo AE, Beaz R, Romalde JL (2004) Species-specific polymerase chain

- reaction primer sets for the diagnosis of *Tenacibaculum maritimum* infection. *Dis Aquat Org* 62:75–83
- Castro N (2008) *Edwardsiella tarda* en rodaballo: virulencia y estrategias de vacunación. Master thesis, Universidad de Vigo, Vigo
- Castro N, Toranzo AE, Barja JL, Núñez S, Magariños B (2006) Characterization of *Edwardsiella tarda* strains isolated from turbot, *Psetta máxima* (L.). *J Fish Dis* 29:541–547
- Chen J, Lai S (1998) PCR for direct detection of *Edwardsiella tarda* from infected fish and environmental water by application of the hemolysin gene. *Zool Stud* 37:169–176
- Edwards U, Rogall T, Bloecker H, Emde M, Boettger EC (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* 28:1942–1946
- Lan J, Zhang ZH, Wang Y, Chen J, Han Y (2008) Isolation of an unusual strain of *Edwardsiella tarda* from turbot and establish a PCR detection technique with the *gyrB* gene. *J Appl Microbiol* 105:644–651
- Osorio CR, Toranzo AE (2002) DNA-based diagnostics in sea farming. In: Fingerman M, Nagabhushanam R (eds) Recent advances in marine biotechnology, seafood and human health, Vol 7. Science Publishers, Enfield, NH, p 253–310
- Osorio CR, Collins MD, Toranzo AE, Barja JL, Romalde JL (1999) 16S rRNA gene sequence analysis of *Photobacterium damsela* and nested PCR method for rapid detection of the causative agent of fish pasteurellosis. *Appl Environ Microbiol* 65:2942–2946
- Plumb JA (1999) *Edwardsiella* septicemias. In: Woo PTK, Bruno DW (eds) Fish diseases and disorders. Viral, bacterial and fungal infections. CABI Publishing, Wallingford, p 479–521
- Romalde JL, López-Romalde S, Ravelo C, Magariños B, Toranzo AE (2004) Development and validation of a PCR-based protocol for the detection of *Pseudomonas anguilliseptica*. *Fish Pathol* 39:33–41
- Sakai T, Iida T, Osatomi K, Kanai K (2007) Detection of Type 1 fimbrial genes in fish pathogenic and non-pathogenic *Edwardsiella tarda* strains by PCR. *Fish Pathol* 42:115–117
- Sakazaki R, Tamura K (1992) The genus *Edwardsiella*. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH (eds) The prokaryotes. Springer-Verlag, Berlin, p 2737–2743
- Thoensen JC (1994) Blue book, Vers 1. Suggested procedures for the detection and identification of certain finfish and shellfish pathogens, 4th edn. American Fisheries Society, Fish Health Section, Bethesda, MD
- Toranzo AE (2007) Enfermedades bacterianas emergentes en cultivos marinos de Peces. In: Cerviño A, Guerra A, Pérez C (eds) Actas del XI Congreso Nacional de Acuicultura. Xunta de Galicia, Vigo, p 1033–1036
- Toranzo AE, Romalde JL, Dopazo CP, Magariños B, Barja JL (2004) Disease trends in the primary marine fish species cultured in Spain: a 20-year study. *World Aquac* 35:35–38
- Toranzo AE, Magariños B, Romalde JL (2005) A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* 246:37–61

Editorial responsibility: Catherine Collins, Aberdeen, UK

Submitted: June 25, 2009; Accepted: January 19, 2010
Proofs received from author(s): April 7, 2010

ORIGINAL ARTICLE

Evaluation of the selective and differential ET medium for detection of *Edwardsiella tarda* in aquaculture systems

N. Castro, A.E. Toranzo, S. Nuñez and B. Magariños

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Biología-CIBUS e Instituto de Acuicultura, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

Keywordsaquaculture, diagnosis, diseases, *Edwardsiella tarda*, selective medium.**Correspondence**Nuria Castro, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Biología-CIBUS e Instituto de Acuicultura, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, 15782 Spain.
E-mail: nuria.castro@usc.es

2011/0542: received 30 March 2011, revised and accepted 5 May 2011

doi:10.1111/j.1472-765X.2011.03080.x

Abstract

Aims: *Edwardsiella tarda* is an important pathogen in aquaculture where it can cause serious losses. A rapid detection of it is vital to minimize the mortalities caused by this disease, and in this work, the effectiveness of the selective differential *Edw. tarda* medium (ET) was evaluated for the diagnosis of edwardsiellosis as well as for its possible use in epidemiological studies.

Methods and Results: ET medium was evaluated in parallel with the commercial *Salmonella-Shigella* agar (SS), which is usually employed for the selective isolation of enteric bacilli. Moreover, two general media (TSA-1 and MA) were employed as a control. The results obtained showed that ET is distinctly selective for the isolation of *Edw. tarda*, allowing its recovery from mixed cultures and natural samples as a unique species. In contrast, although colonies of *Edw. tarda* could be clearly distinguishable in SS because of the appearance of a characteristic black centre, other enteric and nonenteric bacterial species were also able to grow on this medium.

Conclusions: We recommend ET agar as an useful medium for the primary isolation of *Edw. tarda* from aquaculture samples.

Significance and Impact of the Study: The results obtained support ET medium as the most appropriate to develop epidemiological studies of edwardsiellosis in aquaculture and permits an earlier diagnosis of this important disease.

Introduction

Edwardsiella tarda is an enteric bacterial pathogen that presents in a world-wide distribution and a high variety of hosts (Plumb 1993; Austin and Austin 1999). Moreover, edwardsiellosis caused by *Edw. tarda* is a devastating fish disease in freshwater and marine aquaculture industries throughout the world and accounts for severe economic losses (Mohanty and Sahoo 2007). Over the last few years, *Edw. tarda* has become an emergent pathogen in both Europe (Castro *et al.* 2006) and China (Xiao *et al.* 2009).

Because early detection is vital for controlling this disease, methods for rapid and accurate diagnosis of edwardsiellosis would, therefore, be very useful.

Various techniques for the sensitive and rapid detection of *Edw. tarda*: loop-mediated isothermal amplification,

fluorescence *in situ* hybridization and PCR-based methods have been developed in the last years (Ootsubo *et al.* 2002; Yu *et al.* 2004; Savan *et al.* 2005; Castro *et al.* 2010). However, none of them allow for isolation of the aetiological agent and may not be cost-effective, especially when large number of samples must be examined being, usually, more expensive than other traditional identification methods such as biochemical tests or slide agglutination.

In conventional laboratories, diagnosis is normally based on culture media that are of low cost and provide pure cultures of the strains. Isolation and purification of the target pathogen on to agar plates is the first step in the inspection of diseased fish. *Edwardsiella tarda* can grow on the general media usually employed in microbiology laboratories for the recovery of other bacteria such as tripticase soy agar (TSA) or marine agar (MA).

However, identifying a species by biochemical tests usually takes longer than the time available when outbreaks of edwardsiellosis occur in fish populations. The use of selective media is an alternative approach that shows potential, preventing and minimizing the growth of unwanted species without compromising the recovery of the organisms under study. A number of selective and differential media have been developed for species of the family Enterobacteriaceae using MacConkey agar, *Salmonella-Shigella*, among others. In the case of *Edw. tarda*, the commercial medium *Salmonella-Shigella* agar (SS) is commonly used for its isolation (Janda and Abbott 1993).

Based on the intrinsic resistance of *Edw. tarda* strains to colistin (Muyembe *et al.* 1973), Lindquist (1991) designed a selective medium (*Edw. tarda* agar, ET) by adding colistin, among other compounds, to a MacConkey agar base. However, this medium was not evaluated over a wide range of strains, and to our knowledge, no reference of its use has been published. Therefore, in this study, the effectiveness of the selective and differential ET medium was evaluated in comparison with SS agar for the routine diagnosis of *Edw. tarda* in aquaculture, as well as for its possible usefulness in epidemiological studies.

Materials and methods

Culture media

Two selective and differential media were evaluated in this work:

1. SS (Difco Laboratory, Detroit, MI, USA) is designated as a selective and differential media based upon the degree of inhibition of Gram-positive micro-organisms because of their content of bile salts, brilliant green and citrates. Moreover, differentiation of enteric organisms is achieved by the incorporation of lactose in the medium. Organisms that ferment lactose produce acid, which, in the presence of the neutral red indicator, results in the formation of red colonies. Lactose nonfermenters form colourless colonies. In this medium, sodium thiosulphate and ferric citrate enable the detection of hydrogen sulphide production, as evidenced by colonies with black centres.
2. ET agar was developed for the selective and differential isolation of *Edw. tarda* (Lindquist 1991). The medium was designed taking into account the typical biochemical characteristics of *Edw. tarda* by decarboxylation of lysine, formation of hydrogen sulphide from thiosulphate and the lack of mannitol or sucrose fermentation. Thus, theoretically, the differentiation of *Edw. tarda* from most other enteric bacteria would be enhanced on a medium containing lysine, mannitol, sucrose, a pH indicator and a hydrogen sulphide detection system. Moreover, the inclu-

sion of colistin in the medium would severely restrict the variety of enteric bacteria, allowing a better isolation of *Edw. tarda* (Muyembe *et al.* 1973). The ET agar is formulated as follows: in 900 ml of distilled water are added the following: MacConkey agar base, 40.0 g; yeast extract, 1.0 g; and additional agar, 4.5 g. After autoclaving, the following two filter-sterilized solutions are added, bringing the total amount to 1.01 l: (i) 100 ml of distilled water in which are dissolved glucose 2 g; sucrose 5 g; mannitol 5 g; xylose 5 g; L-lysine 10 g; sodium thiosulphate 6.8 g; ferric ammonium sulphate 0.8 g. (ii) 10 ml of colistin in distilled water (1 mg ml⁻¹).

In addition, two general media, usually employed in aquaculture diagnosis laboratories, were also employed as controls: TSA-1 (trypticase soy agar with 1% of CINa; Difco) and MA (marine agar; Difco).

Bacterial strains

Thirteen strains of *Edw. tarda*, isolated from different hosts and including two reference strains, were used to evaluate the culture media. In addition, other heterotrophic bacteria isolated from sea water and fish, as well as other enteric bacteria, *Edwardsiella hoshinae* and *Escherichia coli*, were also included to measure the selectivity of the media (Table 1). The bacterial cells were maintained at -80°C in Cryo-Bille tubes (AES Laboratory, Combourg, France) and recovered before each assay in plates of TSA-1 or MA incubated at 25°C. All strains were confirmed by biochemical test for their identity.

Media selectivity and recovery efficiency

All the strains included in the study were tested for growth on each selective and general media. Cultures of bacteria were suspended in autoclaved saline solution (CINa at 0.85% in distilled water) and adjusted visually to an initial density of 1.2×10^9 CFU ml⁻¹ (tube 4 of Macfarland standard). One loopful (4 mm) of each bacterial suspension was streaked in triplicate onto plates of each culture media. Inoculated plates were incubated at 25°C.

The recovery efficiency of the strains on TSA-1, MA, SS and ET was evaluated by the endpoint dilution method (Daly and Stevenson 1985). Briefly, bacterial strains grown on TSA-1 or MA were harvested in autoclaved SS and adjusted visually to an initial density of 1.2×10^9 CFU ml⁻¹ (tube 4 of Macfarland standard). Then, tenfold dilutions were prepared, and 0.1 ml of each dilution (from 10⁻² to 10⁻⁹) were spread onto the various media. The plates were incubated at 25°C for 24–48 h, and the results were recorded as the endpoint dilution defined as the last dilution of the culture at which growth

Table 1 Comparison of the growth of *Edwardsiella tarda* and other heterotrophic marine bacteria in general (TSA-1 and MA) and selective (SS and ET) media. The endpoint dilution indicates the last dilution of the culture that produced visible growth. Results were recorded after 48 h incubation at 25°C

Strains	Origin	Culture media			
		TSA-1	MA	SS	ET
<i>Edw. tarda</i>					
ACC35.1	Turbot (<i>Scophthalmus maximus</i>)	10 ^{-8*}	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸
HL1.1	Turbot	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸
RM288.1	Turbot	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸
ACR326.1	Turbot	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸
WFE1	Flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸
81.48	Catfish (<i>Ictalurus punctatus</i>)	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸
ACR419.1	Sole (<i>Solea senegalensis</i>)	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸
NCIMB2034	Fish (unknown species)	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸
CECT849.1	Human	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸
KGE7901	Tilapia (<i>Tilapia nilotica</i>)	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸
EDK1	Eel (<i>Anguilla japonica</i>)	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸
FL4-53-4K	Sea Bass (<i>Morone saxatilis</i>)	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸
9.8	Sea Bass	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸
<i>Edwardsiella ictaluri</i>					
CECT885	Catfish	10 ⁻⁸	–	10 ⁻⁶	–
<i>Edwardsiella hoshinae</i>					
DSM13771	Puffin (<i>Fratercula arctica</i>)	10 ⁻⁸	–	10 ⁻⁸	10 ⁻⁵
<i>Escherichia coli</i>					
CECT433	Human	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	–
FV9180	Human	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	–
<i>Hafnia alvei</i>					
15/1403	Trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	–
X130	Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>)	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	–
<i>Yersinia ruckeri</i>					
NCIMB1316	Trout	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	–
1651	Trout	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	–
SRG4.1	Trout	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	–
<i>Vibrio anguillarum</i>					
R82 (O1)	Turbot	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ⁻²	–
RG111 (O2)	Turbot	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻²	–
PC725.1 (O1)	Sea bream (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻²	–
PC696.1 (O2)	Sea bream	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻²	–
<i>Aeromonas hydrophila</i>					
X177	Atlantic salmon	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	–
RPM785.1	Turbot	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	–
<i>Aeromonas salmonicida</i> ssp. <i>salmonicida</i>					
ACR218.1	Turbot	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻²	–
ACR173.1	Turbot	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻²	–
<i>Tenacibaculum maritimum</i>					
NCIMB2451	Red sea bream (<i>Pagrus major</i>)	–	10 ⁻⁸	–	–
PC424.1	Turbot	–	10 ⁻⁸	–	–
ACC13.1	Sole	–	10 ⁻⁸	–	–

–, Absence of growth in any dilution; TSA, tripticase soy agar; SS, *Salmonella-Shigella*; MA, marine agar; ET, *Edw. tarda* medium.

*Endpoint dilution on different media.

was recorded on seeded plates. Each strain was tested in triplicate in each medium.

Distinguishing *Edwardsiella tarda* from mixed bacterial cultures on selective media

Edwardsiella tarda was detected in mixed cultures by mixing equal volumes of pure suspensions of the *Edw. tarda*

strain ACC35.1 (isolated from turbot) with representative strains of the other bacterial fish pathogens included in this study: *Hafnia alvei* (15/1403), *Yersinia ruckeri* (1651), *Aeromonas hydrophila* (X177) *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* (ACR218.1), *Vibrio anguillarum* (R82), *Tenacibaculum maritimum* (ACC13.1) and *Edwardsiella ictaluri* (CECT885). Pure suspensions of each strain were calibrated by serial tenfold dilutions in saline solution and

counted on TSA-1 or MA. TSA-1, MA, SS and ET plates were inoculated with 100 µl of the mixed suspension, incubated at 25°C and examined after 24 and 48 h. Each assay was carried out in triplicate.

Isolation of *Edwardsiella tarda* from spiked tissues

As a preliminary assay for the availability of SS and ET in the recovery of *Edw. tarda*, samples of kidney from turbot, which were previously designated free of *Edw. tarda* were spiked with a pure culture of isolate ACC35.1. Samples of 1 g of kidney were aseptically homogenised with 100 µl of saline solution by repeated pipetting. Kidney homogenates were seeded with 100 µl of the different dilutions of the *Edw. tarda* culture suspension. After incubation for 1 h, 100 µl of each seeded sample was plated onto SS and ET plates and incubated at 25°C for 24–48 h. Ten colonies from the agar plates, displaying typical *Edw. tarda* morphology on SS (small, transparent with black centres) and ET (clear to whitish with black centres), were isolated and identified by biochemical tests as well as by slide agglutination with specific antiserum (Castro et al. 2006).

Isolation and presumptive identification of *Edwardsiella tarda* from natural samples

All the culture media were also tested for the recovery of *Edw. tarda* from field samples. For this purpose, samples were taken from five fish stocks of a turbot farm suffering continuous disease problems associated with *Edw. tarda*. From each stock, ten fish were analysed. For bacterial isolation, samples of liver, spleen and kidney as well as external lesions were taken under aseptic conditions and spread directly onto plates of TSA-1, MA, SS and ET. The amount of each type of colony was estimated after incubation (25°C for 24 h) and isolated in pure culture. The taxonomic position of the bacterial strains was determined by using standard morphological and physiological plate and tube tests. The results are expressed as the percentage of strains belonging to each bacterial species in relation to the total isolates recovered in each culture medium.

Results

Parallel inoculations onto different culture media of 13 *Edw. tarda* strains as well as 20 strains belonging to other enteric and nonenteric species revealed that ET medium was the most selective. In fact, only the 13 *Edw. tarda* isolates and the *Edw. hoshinae* reference strain could grow on this medium. In both selective SS and ET media, all *Edw. tarda* isolates showed a black centre,

indicating that H₂S has been produced (Fig. 1a,b). Little differences in the appearance of the colonies on both media were detected. While in SS, they were translucent and assumed the colour of the medium, colonies of *Edw. tarda* in ET medium appeared clear to whitish. On SS, in addition to all the enteric strains tested, other nonenteric genera as *Vibrio* or *Aeromonas* presented capacity to grow at low dilutions. With regard to general media, TSA-1 supported growth of the majority of the species tested with the exception of the *T. maritimum* strains, which could grow on MA. Only the reference strains of *Edw. ictaluri* and *Edw. hoshinae* failed to grow on this medium (Table 1).

When endpoint dilution assays were performed, the efficiency of recovery of *Edw. tarda* was very similar in all the media studied, regardless of their selective properties. In fact, endpoint dilution values were very similar on TSA-1, SS and ET (10⁻⁸) (Table 1). Only MA medium exhibited a stressing effect on *Edw. tarda* maybe because of its greater salinity (Table 1).

In mixed cultures assays, selection of *Edw. tarda* was distinctly more effective on ET because only colonies belonging to this species appeared on this medium after incubation. In contrast, in SS, with the exception of *T. maritimum*, all bacteria were able to grow when directly mixed samples were plated. However, in all these mixed cultures, *Edw. tarda* could be clearly differentiated from the other species by the appearance of colonies with a characteristic black centre. Figure 1c,d show a representative example of a mixed pair of cultures in both selective media.

ET and SS agar plates inoculated with seeded kidneys presented typical colonies with black centres after incubation at 25°C for 24–48 h. Ten randomly picked colonies from each SS and ET plate were all positively identified as presumptive *Edw. tarda*. However, the total number of colony forming units (CFU) recovered was one logarithm lower on SS than on ET (data not shown).

The media used in this work were also employed in natural samples to evaluate their effectiveness for the early identification of *Edw. tarda* in disease diagnosis and epidemiological studies (Fig. 2). In all the fish stocks tested, recovery of *Edw. tarda* was possible on the four media (general and selective) from internal organs as well as from external lesions. However, we observed that in those cases in which other bacteria were present, such as opportunistic bacteria in external lesions (i.e. *Vibrio* sp., *Vibrio alginolyticus*), or other pathogens in internal organs (i.e. *Aer. salmonicida* ssp. *salmonicida*), only the ET medium was selective for the isolation of *Edw. tarda*. In SS medium, the growth of mixed cultures obscured in some cases the recovery of *Edw. tarda* because of colonization of the plate by fast-growing marine bacteria.

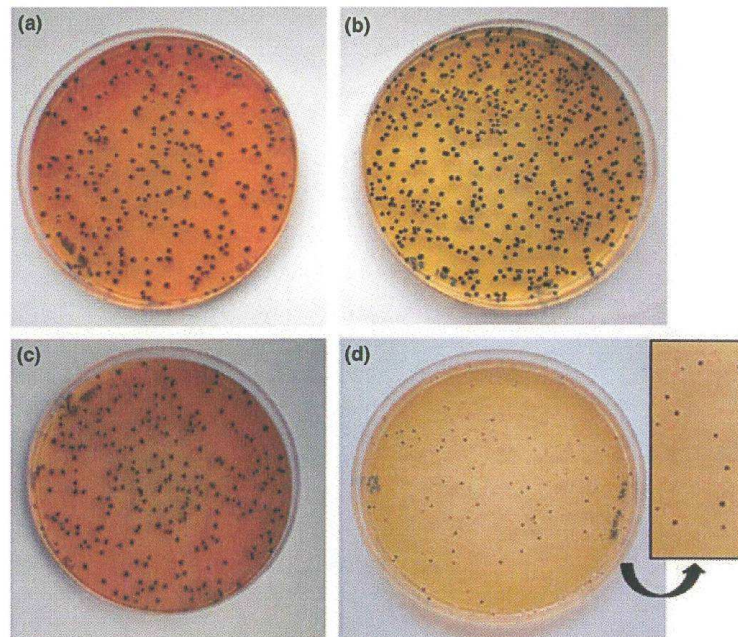


Figure 1 Colonies plated from a pure culture of *Edwardsiella tarda* on (a) ET agar and (b) SS and from (c) a mixed culture of *Edw. tarda* with *Yersinia ruckeri* on ET (only *Edw. tarda* colonies are present) and (d) SS (colonies of both species are grown). In both media, the *Edw. tarda* colonies showed the typical blank centre indicating H_2S production. SS, *Salmonella-Shigella*; *Edw. tarda* medium.

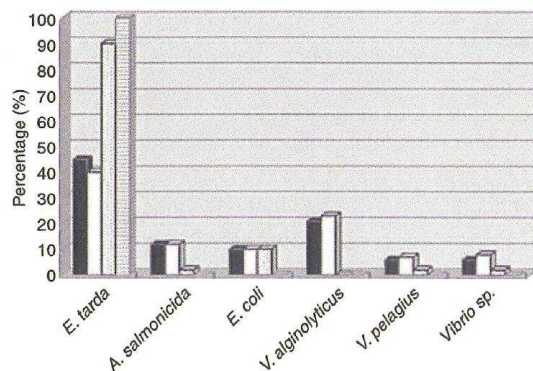


Figure 2 Percentage of strains belonging to different bacterial groups in relation to the total isolates recovered in each culture medium (TSA-1, MA, SS and ET) in the field sample study. (■) TSA-1; (□) MA; (▨) SS and (▤) ET. TSA, tripticase soy agar; SS, *Salmonella-Shigella*; MA, marine agar; ET, *Edwardsiella tarda* medium.

Discussion

In the event of a fish disease outbreak, a quick intervention with control and treatment measures is essential to preclude or minimize mortality and disease spread to other populations. Effective control of a bacterial disease can be dependent upon identification of the pathogen by primary bacterial culture. This approach offers a definitive diagnosis and allows for subsequent antimicrobial sensitivity testing against candidate therapeutic agents, which minimizes the development of

antibiotic-resistant strains. It also provides a source of isolates from various hosts or geographical areas that can be archived and used in research. These bacterial cultures must be performed employing bacteriologic media.

In this work, two selective and differential media, SS and ET, were evaluated for their usefulness in the diagnosis of *Edw. tarda*. Two general media were used as controls. TSA-1 was selected as the normal medium employed for diagnosis in aquaculture laboratories, which allows the recovery of both fresh water and marine bacteria. In contrast, MA contains all of the nutrients necessary for the growth of marine bacteria and permits the recovery of some fastidious species of the *Tenacibaculum* genus.

The results obtained in this work from pure and mixed cultures and seeded tissues showed that, on selective media (ET and SS), *Edw. tarda* was clearly distinguishable because its colonies showed a characteristic black centre (Fig. 1a,b). However, ET was the most selective medium because *Edw. tarda* and *Edw. hoshinae* were the only bacterial species that could grow on it. Only about 0.1% of the total colonies of *Edw. hoshinae* exhibited the black point. Moreover, the occurrence of this species in natural samples is very unusual, and only a few isolations, mostly from birds and reptiles, have been published (Grimont et al. 1980). Although SS is a selective medium for enteric bacilli, our results indicated that it allowed the growth of other nonenteric species.

The analysis of natural samples showed that there are differences in the time consuming of the diagnosis of

Edw. tarda depending of the medium employed. When general media as TSA-1 and MA or the selective SS medium were used, an isolation step would be necessary if mixed bacterial cultures were present. This implies that *Edw. tarda* diagnosis procedures face a delay of at least 24 h. However, when the samples were spread on ET agar, only pure cultures of this pathogen were obtained with no growth of other bacteria, thus allowing the direct use of these plates for a confirmative identification of *Edw. tarda*.

In summary, we propose ET medium as the most appropriate to carry out epidemiological studies of edwardsiellosis in aquaculture systems because it permits the recovery of *Edw. tarda* and avoids the growth of unwanted species. In addition, the use of ET medium in parallel with other general media as TSA-1 or MA in fish diseases laboratories could contribute to an earlier diagnosis of this important disease.

Acknowledgements

The authors gratefully thank Dr John A. Lindquist, Department of Bacteriology, University of Wisconsin, Madison, USA, for the information supplied about the ET medium. This work was supported in part by grant no. AGL2009-08859 from the Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain, and Action 2006/37-Competitive Reference Groups from the Consellería de Educación, Xunta de Galicia, Spain.

References

- Austin, B. and Austin, D.A. (1999) Characteristics of the diseases. In *Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish*, 3rd edn ed. Austin, B. and Austin, D.A. pp. 13–15. Heidelberg: Springer-Verlag.
- Castro, N., Toranzo, A.E., Barja, J.L., Núñez, S. and Magariños, B. (2006) Characterization of *Edwardsiella tarda* strains isolated from turbot. *J Fish Dis* **29**, 541–547.
- Castro, N., Toranzo, A.E., Núñez, S., Osorio, C.R. and Magariños, B. (2010) Evaluation of four polymerase chain reaction primer pairs for the detection of *Edwardsiella tarda* in turbot. *Dis Aquat Org* **90**, 55–61.
- Daly, J.G. and Stevenson, R.M.W. (1985) Charcoal agar, a new growth medium for the fish disease bacterium *Renibacterium salmoninarum*. *Appl Environ Microbiol* **50**, 868–871.
- Grimont, P.A.D., Grimont, F., Richard, C. and Sakazaki, R. (1980) *Edwardsiella hoshinae*, a new species of Enterobacteriaceae. *Curr Microbiol* **4**, 347–351.
- Janda, J.M. and Abbott, S.L. (1993) Infections associated with the genus *Edwardsiella*: the role of *Edwardsiella tarda* in human disease. *Clin Infect Dis* **17**, 742–748.
- Lindquist, J.A. (1991) Medium and procedure for the direct, selective isolation of *Edwardsiella tarda* from environmental water samples. *Abstr Annu Meet Am Soc Microbiol C-303*, 302.
- Mohanty, B.R. and Sahoo, P.K. (2007) Edwardsiellosis in fish: a brief review. *J Biosci* **32**, 1331–1344.
- Muyembe, T., Vandepitte, J. and Desmyter, J. (1973) Natural colistin resistance in *Edwardsiella tarda*. *Antimicrob Agents Chemother* **4**, 521–524.
- Ootsubo, M., Shimizu, T., Tanaka, R., Sawabe, T., Tajima, K., Yoshimizu, M., Ezura, Y., Ezaki, T. et al. (2002) Oligonucleotide probe for detecting Enterobacteriaceae by in situ hybridization. *J Appl Microbiol* **93**, 60–68.
- Plumb, J.A. (1993) *Edwardsiella* septicaemia. In *Bacterial Diseases of Fish* ed. Inglis, V., Roberts, R.J. and Bromage, N.R. pp. 61–79. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Savan, R., Kono, T., Itami, T. and Sakai, M. (2005) Loop-mediated isothermal amplification: an emerging technology for detection of fish and shellfish pathogens. *J Fish Dis* **28**, 573–581.
- Xiao, J., Wang, Q., Liu, Q., Wang, X., Liu, H. and Zhang, Y. (2009) Isolation and identification of fish pathogen *Edwardsiella tarda* from mariculture in China. *Aquacult Res* **40**, 13–17.
- Yu, L., Yuan, L., Feng, H. and Li, S.F. (2004) Determination of the bacterial pathogen *Edwardsiella tarda* in fish species by capillary electrophoresis with blue light-emitting diode-induced fluorescence. *Electrophoresis* **25**, 3139–3144.

Sección 7

Estudios de vacunación contra la edwardsiellosis

7.1.- INTRODUCCIÓN

Debido a que las infecciones por *E. tarda* pueden verse favorecidas por determinadas condiciones ambientales, el primer y más básico método de prevención de la enfermedad es el mantenimiento de los parámetros fisicoquímicos del agua de cultivo en valores adecuados y de la higiene y condiciones sanitarias de la instalación. Sin embargo, al igual que ha ocurrido a lo largo de los años con otras patologías de peces, han sido varios los esfuerzos encaminados al desarrollo de diferentes métodos de prevención y control de la edwardsielosis.

7.1.1.- Aspectos generales de la prevención y control de la edwardsielosis:

En los primeros trabajos en los que se estudió la sensibilidad a agentes quimioterápicos de *E. tarda* se describió a esta bacteria como una especie susceptible a compuestos como: cefalosporinas, aminoglicósidos, penicilinas, imipenem, aztreonam, ciprofloxacina, trimetropim-sulfametoxazol, nitrofuratoína, quinolonas y antibióticos inhibidores de la betalactamasa (Waltman & Shotts, 1986; Clarck y col., 1991). Posteriormente, Jin Jun y col. (2004) describieron cuatro genes que determinaban la resistencia a tetraciclina en *E. tarda*: tet-A, tet-D, tet-B y tet-G; estando los dos primeros presentes en un plásmido móvil. Estudios posteriores realizados por Sahoo & Mukherjee (1997), Zhang y col. (2005) y Zhu y col. (2006) encontraron que estas cepas resistentes a tetraciclina, eran sensibles a otros agentes quimioterápicos como la norfloxacina, ciprofloxacina, oxitetraciclina, gentamicina, cloranfenicol y cefazolin. Sin embargo, el uso excesivo de antibióticos y otros agentes químicos en acuicultura está siendo cada vez más restringido por las autoridades sanitarias en los países desarrollados debido a la selección de cepas resistentes y a problemas medioambientales.

Ya que los factores de estrés tales como las altas densidades de población, malnutrición, cambios en la temperatura del agua, pH o fluctuaciones del oxígeno disuelto pueden facilitar la aparición y desarrollo de la edwardsielosis en los peces, el empleo de determinados probióticos y sustancias inmunoestimulantes como ácido ascórbico o lipopolisacáridos puede resultar una buena medida de prevención de la enfermedad. Sahoo & Mukherjee (2002) probaron una serie de sustancias en carpa india (*Labeo rohita*) contra la infección por *E. tarda*. Encontraron que la administración de β -1,3 glucano de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* en dosis de 0,1

mg/kg de pienso durante 7 días o de levamisol en dosis de 5 mg/kg de pienso en 5 administraciones con intervalos de 3 días era efectiva en el tratamiento de la edwardsielosis reduciendo la mortalidad de las carpas. Además, estas sustancias también conferían protección frente a otros patógenos bacterianos, virales, parasitarios o fúngicos sin crear riesgos ambientales. Kim y col. (2003) no encontraron efectos sinérgicos cuando se suplementaba la alimentación de los peces con ácido ascórbico, selenio y alfa-tocoferil acetato en cultivos de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) inoculadas experimentalmente con *E. tarda*. Sin embargo, en estudios posteriores, Wang Z. y col. (2006) demostraron que el aumento de la dosis administrada diariamente a los peces de vitamina E suplementada con 213 mg de α -tocoferol por kilogramo de pienso disminuía las bajas y retrasaba la aparición de las mortalidades en inoculaciones experimentales de platija japonesa. Además, también describieron que la administración en la dieta de vitamina E y n-3 HUFA (ácidos grasos insaturados) conjuntamente producían un efecto sinérgico en la respuesta no específica y en la resistencia a la enfermedad.

Pirarat y col. (2006) publicaron que, en peces infectados por *E. tarda*, la administración de *Lactobacillus rhamnosus* potenciaba la vía alternativa del complemento en el sistema inmune de los peces, permitía la agregación de células fagocíticas y aumentaba su actividad y, por lo tanto, protegía al pez frente a una septicemia aguda. Taoka y col. (2006) también describieron los efectos beneficiosos que confería a los peces la administración de probióticos comerciales como *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Clostridium butyricum* y *Saccharomyces cerevisiae*. Estos organismos aumentaban la respuesta no específica del sistema inmune de los peces y mejoraban la supervivencia de tilapias a las infecciones causadas por *E. tarda*.

7.1.2.- Antecedentes de la vacunación contra la edwardsielosis:

Los primeros intentos de desarrollo de vacunas contra *E. tarda* se centraron fundamentalmente en el desarrollo de 2 tipos de formulaciones vacunales: las bacterinas (células inactivadas con formol o calor), y las vacunas desarrolladas a partir de extractos celulares. Estos primeros estudios experimentales fueron llevados a cabo principalmente en anguilas.

Inicialmente, el uso de bacterinas pareció dar un buen grado de protección, si bien éste no resultó lo suficientemente alto ni duradero para su explotación comercial. Los métodos empleados para su administración variaron desde la inmersión corta, la inyección, la difusión en spray o la administración oral vía pienso. Los métodos que resultaron dar un mejor nivel de anticuerpos tras la vacunación fueron el de la inmersión y la inyección (Salati, 1988), sin embargo, estos datos no se correlacionaron con los valores de supervivencia tras la infección, lo que indicaba que ambos valores no están estrictamente correlacionados.

Salati (1988) intentó también la purificación de antígenos o extractos celulares con el fin de conseguir una formulación vacunal más efectiva. Si bien los primeros resultados parecían alentadores, se encontraron dos principales problemas en el uso de este tipo de vacunas: en primer lugar, el costo de su desarrollo comercial resultaba demasiado elevado y, en segundo lugar, la administración de la vacuna vía inmersión no confería buenos valores de protección (*E. tarda* afecta especialmente a las edades más tempranas en los cultivos de anguila, por lo que la administración de la vacuna vía inyección resultaba inviable).

Más recientemente, se han realizado otros estudios de vacunación, tanto empleando diferentes formulaciones vacunales, como empleando diferentes especies de peces. Así, Igarashi e Iida (2002), realizaron una comparación entre una vacuna con células vivas de una cepa mutante con baja producción de sideróforos y una bacterina elaborada con la cepa salvaje. La protección que conferían ambas formulaciones fue ensayada en tilapia y los resultados mostraron que, a pesar de que ambas vacunas producían un aumento en los niveles de anticuerpos, la bacterina no confería buenos niveles de protección, con mortalidades del 80 o 100% en los peces vacunados. Por el contrario, la vacuna con células vivas dio buenos resultados, no observándose ninguna baja hasta 4 semanas post-vacunación. Sin embargo, la explotación comercial de este tipo de vacunas desarrolladas con células vivas, se ve muy limitada por la legislación vigente en muchos países.

A pesar de los esfuerzos realizados en el desarrollo de una vacuna eficaz contra *E. tarda*, no existe hasta el momento ninguna vacuna comercial contra la edwardsielosis que pueda minimizar las graves pérdidas que esta bacteria produce en los distintos cultivos de peces en todo el mundo. Sin embargo, como podrá verse en este trabajo, se ha desarrollado una vacuna adyuvantada que otorga

elevados niveles de protección en rodaballo frente a *E. tarda* incluso 6 meses después de la vacunación (Castro y col., 2008).

En este capítulo se elaboraron 2 tipos diferentes de vacunas frente a *E. tarda*: una bacterina acuosa y una vacuna adyuvantada con aceite no mineral. En ambos casos se estudió la protección conferida en rodaballo a lo largo del tiempo utilizando diversas rutas de administración, tanto en términos de porcentaje relativo de supervivencia (RPS) como de niveles de anticuerpos presentes en los peces (técnica de ELISA).

7.2.- MATERIALES Y MÉTODOS

La cepa seleccionada para la elaboración de las vacunas fue el aislado de rodaballo ACC35.1, que presenta una LD_{50} de $2.6 \times 10^0 \pm 0.2$ CFU/g a 18 ° C (ver sección 5). También se empleó la cepa de lubina 9.8 para los estudios de protección cruzada.

7.2.1.- Desarrollo de la vacuna acuosa (bacterina):

La primera de las vacunas que se desarrolló fue una bacterina acuosa, consistente en células bacterianas inactivadas con formol.

A partir de preinóculos en fase logarítmica de la cepa ACC35.1 en TSC-1 (caldo triptona de soja, Pronadisa, suplementado con 1% de ClNa) se inocularon matraces de 2 litros del mismo medio. La incubación se realizó a 25° C durante 48 h y cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 1 (Absorbancia₅₈₀, aproximadamente 10^{10} cel/ml), se añadió formol a una concentración final de 0,35% para matar las bacterias. A continuación, se mantuvo durante 3 h en agitación, al cabo de las cuales se pasó a 4° C.

Para llevar a cabo el control de esterilidad de la vacuna se sembró la preparación vacunal en placas de TSA-1 y en tubos de tioglicolato y se incubó durante 72 h a 25° C y 37° C respectivamente para comprobar que no se producía crecimiento bacteriano.

La posible toxicidad de la preparación vacunal se comprobó mediante la inoculación via i.p. de rodaballos de 10 g de peso.

Una vez comprobadas la esterilidad e inocuidad de la vacuna, se procedió a su embasado en botellas estériles de 1 l.

7.2.2.- Desarrollo de la vacuna adyuvantada:

El procedimiento para la realización de la vacuna adyuvantada fue similar al descrito anteriormente para la bacterina acuosa pero, a diferencia de ésta, tras la inactivación de las células bacterianas con formol y la agitación durante 4 h, se procedió a añadir el adyuvante a la vacuna. El adyuvante seleccionado fue el Montanide ISA 763 A VG (Seppic, Francia), aceite de tipo no mineral que se mezcló con la bacterina acuosa en una relación 70:30 respectivamente, hasta obtener una emulsión fluida estable.

7.2.3.- Evaluación de las formulaciones vacunales:**a) Vacunación de peces:**

En estos ensayos se vacunaron rodaballos de 10 g de peso que se mantuvieron en tanques de 50 l con aireación constante.

Antes de la vacunación, los peces se examinaron mediante métodos bacteriológicos y serológicos (Thoesen, 1994), con el objeto de confirmar la ausencia de patógenos que pudiesen interferir en los experimentos.

La vacunación se realizó mediante dos vías de administración: inyección intraperitoneal (i.p.) y baño. En los experimentos de inmunización vía i.p. las diferentes formulaciones vacunales se administraron mediante la inyección de 0,1 ml de la vacuna acuosa o adyuvantada respectivamente. En los experimentos de inmunización por baño, los peces se sumergieron durante 60 seg con aireación en la vacuna acuosa diluida 1:10 (v/v) en agua de mar estéril (Magariños y col., 1994).

Se vacunaron 6 grupos de 250 peces cada uno:

- ✓ Grupo 1: vacunado por inmersión con bacterina.
- ✓ Grupo 2: vacunado vía i.p. con bacterina.
- ✓ Grupo 3: vacunado vía i.p. con la vacuna adyuvantada.
- ✓ Grupo 4: grupo control sumergido durante 60 s en solución salina estéril diluida 1:10 (v/v) con agua de mar estéril.
- ✓ Grupo 5: grupo control inoculado vía i.p. con 0,1 ml de solución salina estéril.
- ✓ Grupo 6: grupo control inoculado vía i.p. con 0,1 ml de una emulsión de adyuvante y solución salina en proporción 70:30 respectivamente.

b) Determinación de la protección mediante el cálculo del Porcentaje Relativo de Supervivencia (RPS):

Un mes post-vacunación, se inocularon tres réplicas de 10 peces de cada uno de los seis grupos vía i.p. con 0,1 ml de una suspensión bacteriana de la cepa homóloga ACC35.1 ajustada a 10^4 cel/ml. En paralelo, se realizaron también ensayos empleando la cepa heteróloga 9.8, con el objeto de determinar la posible protección cruzada.

Las mortalidades se registraron hasta 20 días tras la primera mortalidad y todos los peces muertos fueron examinados con el fin de confirmar el reislamiento de la cepa inoculada a partir de órganos internos (hígado y riñón) mediante siembra directa en placas de TSA-1. También se examinaron internamente los peces para descartar posibles efectos causados por el adyuvante como adhesiones internas.

La determinación de la protección conferida por las diferentes vías de administración se expresó en términos de Porcentaje Relativo de Supervivencia (RPS) empleando la fórmula:

$$RPS = 1 - (\% \text{ mortalidad peces vacunados} / \% \text{ mortalidad peces no vacunados}) \times 100$$

En aquellos grupos en los cuales la protección fue mayor o igual al 60% para el caso de la vacunación por baño y del 75% para la vacunación por i.p. (recomendaciones de Farmacopea Europea; European Pharmacopoeia, 2002), las inoculaciones experimentales se repitieron a los 2, 3, 4 y 6 meses post-vacunación empleando la cepa homóloga.

Los rodaballos, también se pesaron (30 peces de cada grupo) en los meses 0, 1, 3 y 6 post-vacunación con el fin de determinar la posible influencia de la vacunación en la tasa de crecimiento de los peces.

c) Determinación de la protección mediante la determinación del nivel de anticuerpos (ELISA):

Antes de cada una de las inoculaciones experimentales, se tomó suero de 8 a 10 peces de cada uno de los grupos con el fin de realizar mediciones del nivel de anticuerpos empleando la técnica ELISA indirecto (Estévez y col., 1994).

Básicamente, consiste en la inmovilización en la placa de ELISA del antígeno del cual queremos saber si existen anticuerpos específicos en el suero problema. Los pasos siguientes serían la adición del suero problema, incubación y lavado, adición del conjugado, incubación y lavado, finalizando con la adición del sustrato, el frenado de la reacción y la lectura.

En nuestro caso empleamos una placa de 96 pocillos de poliestireno (Nunc-Inmuno™ Plate MaxiSorp™ Surface, Dinamarca) y el protocolo descrito previamente por Estévez y col. (1994) con ligeras modificaciones.

Los pocillos se tapizaron con 50 µl del antígeno de la cepa ACC35.1 (empleada para la elaboración de las distintas formulaciones vacunales) diluido en PBS. Para el control negativo se emplearon 50 µl de PBS estéril. A continuación se incubó la placa a 4º C durante toda la noche. Tras la incubación, los pocillos se lavaron 10 veces con 100 µl de TTBS. Para el bloqueo del antígeno a las paredes del pocillo, se añadieron 200 µl por pocillo de TBS suplementado con un 5% de leche descremada (Sigma) y se mantuvo la placa con agitación suave y constante durante 1 hora a 25º C. Nuevamente, se lavaron los pocillos con 200 µl de TTBS y, a continuación, se añadió 50 µl del suero

(diluido 1:100 en PBS) del cual se quería conocer el nivel de anticuerpos. La placa se mantuvo en agitación suave a 25° C durante 1 hora, tras lo cual se volvió a lavar los pocillos con 200 µl de TTBS. Para la adición del conjugado, se añadió a cada pocillo 50 µl de Anti-turbot IgM (Aquatic Diagnostic) diluido 1:100 en TBS con un 3% de leche descremada y se incubó la placa a 25° C durante 30 min con agitación suave. Se lavaron los pocillos con 100 µl de TTBS y posteriormente se añadió 50 µl por pocillo del anticuerpo cabra anti-Mouse IgG conjugada con peroxidasa (Bio-Rad) diluido 1:1000 en TBS con 3% de leche descremada. La placa fue incubada a 25° C con agitación constante durante 30 min. Por último, se lavó la placa con 100 µl de TTBS y se realizó el revelado añadiendo a cada pocillo 100 µl de TMB (peroxidasa) (Bio-Rad) e incubando la placa en oscuridad durante 30 min 25° C. Con el revelado, el contenido de los pocillos toma un color azulado. La reacción se detiene añadiendo 50 µl de H₂SO₄ 1 N a cada pocillo que reacciona con el TMB proporcionando a la reacción un color amarillento (de mayor o menor intensidad según la concentración de anticuerpos presentes).

La lectura de la placa se realizó a una densidad óptica de 450 nm en un lector ELISA (Titertek Multiscan MK II, Labsystems, Finlandia) y los resultados se tomaron como positivos o negativos en función de la fórmula descrita por Hudson y Hay (1991):

$$\text{D.O. título} = (\text{D.O. test} - \text{D.O. negativo}) / \text{D.O. negativo}$$

Se tomaron como valores positivos aquellos iguales o superiores a 2 y negativos los inferiores a este valor.

d) Análisis estadístico de los resultados:

Los resultados de RPS y niveles de anticuerpos para los diferentes ensayos se muestran como la media de los resultados de cada una de las réplicas realizadas \pm la desviación estándar. Con el objetivo de evaluar la significancia de las diferencias entre los resultados obtenidos con ambas formulaciones vacunales por diferentes vías de administración y con respecto a los grupos control, se empleó el Test de Student. Los valores se consideraron significativamente diferentes cuando se obtenían valores de $P < 0.05$.

7.3.- RESULTADOS

7.3.1.- Eficacia de las formulaciones vacunales un mes postvacunación:

Los resultados obtenidos mostraron que, un mes postvacunación, la protección conferida variaba en función del tipo de vacuna y de la vía de administración.

Así, en el caso del grupo 1 de peces, vacunado vía baño con la bacterina acuosa, se observó que el RPS conferido por la vacuna a los rodaballos era tan sólo de un 13,33% y los niveles de anticuerpos frente a *E. tarda* aumentaban muy ligeramente con respecto a los obtenidos para el grupo 4 (grupo control) (Figuras 7.3 y 7.4). Basándonos en estos datos, no se realizaron más experimentos en meses posteriores con este grupo de peces.

En los casos de los grupos 2 y 3, vacunados vía i.p. con las dos formulaciones vacunales evaluadas en este estudio, los resultados obtenidos fueron significativamente mejores. Así, para el caso del grupo 2, vacunado con la vacuna acuosa, al mes postvacunación se obtuvieron valores de RPS de 80% y niveles de anticuerpos de 2,105, lo que representaba una buena protección frente a la edwardsielosis. En el grupo 3, inmunizado con la vacuna adyuvantada, los valores obtenidos para RPS y niveles de anticuepos fueron del 100% y 2,462 respectivamente. A pesar de que ambas vacunas confieren elevados niveles de protección en términos de RPS y niveles de anticuerpos, al analizar estadísticamente los valores obtenidos, pudieron observarse diferencias significativas ($P < 0.05$) entre ambos grupos de peces.

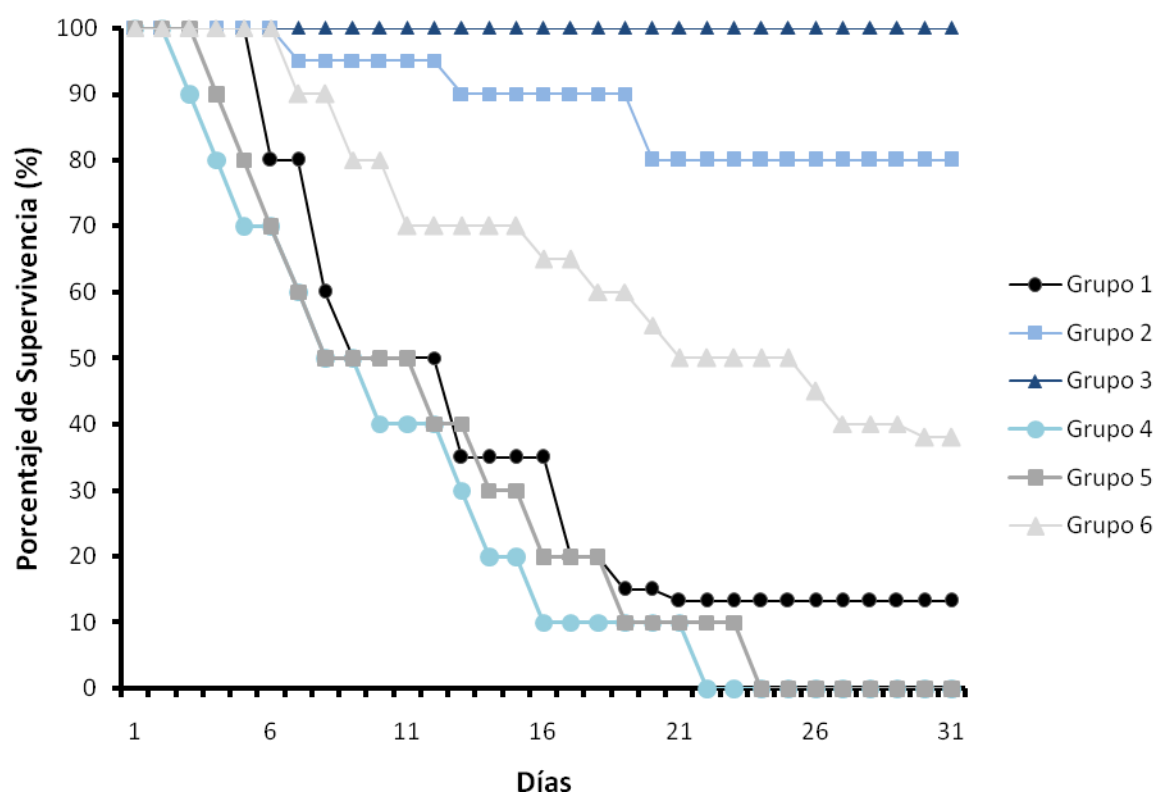


Figura 7.3.- Porcentajes de Supervivencia obtenidos en las inoculaciones experimentales empleando la cepa ACC35.1 un mes postvacunación. Grupo 1, inmunizado con la vacuna acuosa por baño; Grupo 2, vacunado vía i.p. con la vacuna acuosa; Grupo 3, vacunado vía i.p. con la vacuna adyuvantada; Grupo 4, rodaballos control sumergidos en SS diluída 1:10 en agua de mar; Grupo 5, rodaballos control inoculados con SS vía i.p.; Grupo 6, rodaballos inoculados con una emulsión de adyuvante y SS (70:30 respectivamente).

Con respecto a los grupos 4, 5 y 6 (grupos control), los ensayos de inoculación mostraron una mortalidad del 100% de los peces para los grupos 4 y 5, mientras que el grupo 6, inoculado con una emulsión de solución salina y adyuvante (30:70 respectivamente), sí mostró ciertos niveles de protección en términos de RPS (38%) calculado en relación al grupo inoculado sólo con solución salina (grupo 5). En ninguno de estos tres grupos los valores de niveles de anticuerpos en el suero de los peces mostraron incrementos significativos 1 mes postvacunación (Figuras 7.2 y 7.3).

Los ensayos de inoculación empleando la cepa heteróloga 9.8, mostraron valores de RPS y niveles de anticuerpos similares a los obtenidos cuando se empleó la cepa homóloga (datos no mostrados).

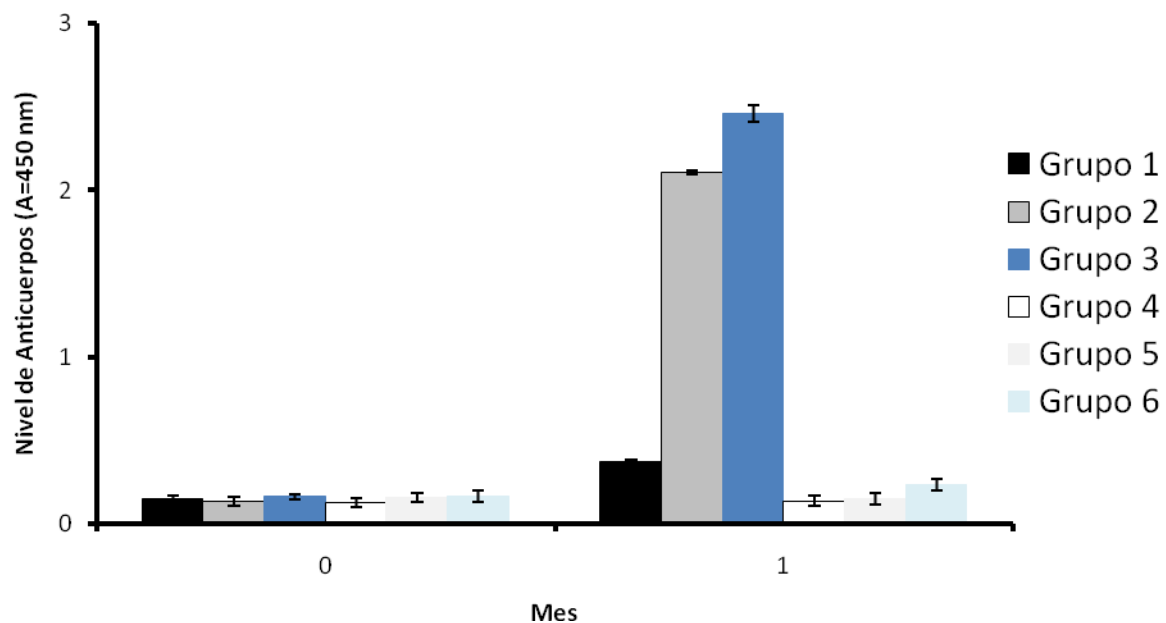


Figura 7.4.- Niveles de anticuerpos en rodaballo antes y un mes postvacunación. Grupo 1, inmunizado con la vacuna acuosa por baño; Grupo 2, vacunado vía i.p. con la vacuna acuosa; Grupo 3, vacunado vía i.p. con la vacuna adyuvantada; Grupo 4, rodaballos control sumergidos en SS diluída 1:10 en agua de mar; Grupo 5, rodaballos control inoculados con SS vía i.p.; Grupo 6, rodaballos inoculados con una emulsión de adyuvante y SS (70:30 respectivamente). Las barras indican la desviación estándar.

7.3.2.- Duración de la protección:

En base a los resultados obtenidos un mes postvacunación, se realizaron cuatro inoculaciones posteriores empleando los lotes de peces inmunizados vía i.p. con la bacterina y la vacuna adyuvantada (correspondientes a los meses 2, 3, 4 y 6 postvacunación). Los resultados de duración de la protección conferida obtenidos en estas inoculaciones están representados en las Figuras 7.5 y 7.6.

El grupo 2, correspondiente a los rodaballos inmunizados vía i.p. con la vacuna acuosa, mostró niveles de RPS relativamente altos durante los tres primeros meses tras la vacunación (80%, 71.5% y 61% para los meses 1, 2 y 3 postvacunación respectivamente). Sin embargo, este descenso gradual observado en los tres primeros meses, continuó hasta el sexto mes, donde se obtuvo un valor del 20%. Con los valores de niveles de anticuerpos en el suero de los peces, se pudo observar una tendencia similar, con valores altos en los primeros meses postvacunación que iban decreciendo a lo largo del tiempo y que llegaron a niveles de 0.957 en el sexto mes.

Con respecto al grupo 3, vacunado vía i.p. con la vacuna adyuvantada, los datos obtenidos mostraron que esta vacuna confiere un elevado grado de protección durante, al menos, los 6 primeros meses postvacunación, con valores de RPS del 100% durante los tres primeros meses postvacunación y del 98% y 90% en los meses 4 y 6 respectivamente. En cuanto a los niveles de anticuerpos, a pesar de que se pudo observar un ligero descenso de los valores desde el primer mes hasta el último, éstos se mantuvieron por encima de 1.6 durante todo el experimento encontrando, además, diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) con respecto a los datos obtenidos para la vacuna acuosa.

Mientras que en el grupo control 5, las mortalidades en las inoculaciones experimentales fueron del 100% en todos los casos, hay que señalar, que en el grupo 6 se observó una cierta protección inespecífica conferida por el adyuvante que se mantuvo durante todo el estudio con valores de RPS comprendidos entre 32-38%.

Los resultados observados en el pesado de los rodaballos demostraron que no parecen existir efectos en la tasa de crecimiento por causa de la administración del adyuvante. Además, tampoco se observó restos del mismo adheridos a los órganos internos de los peces.

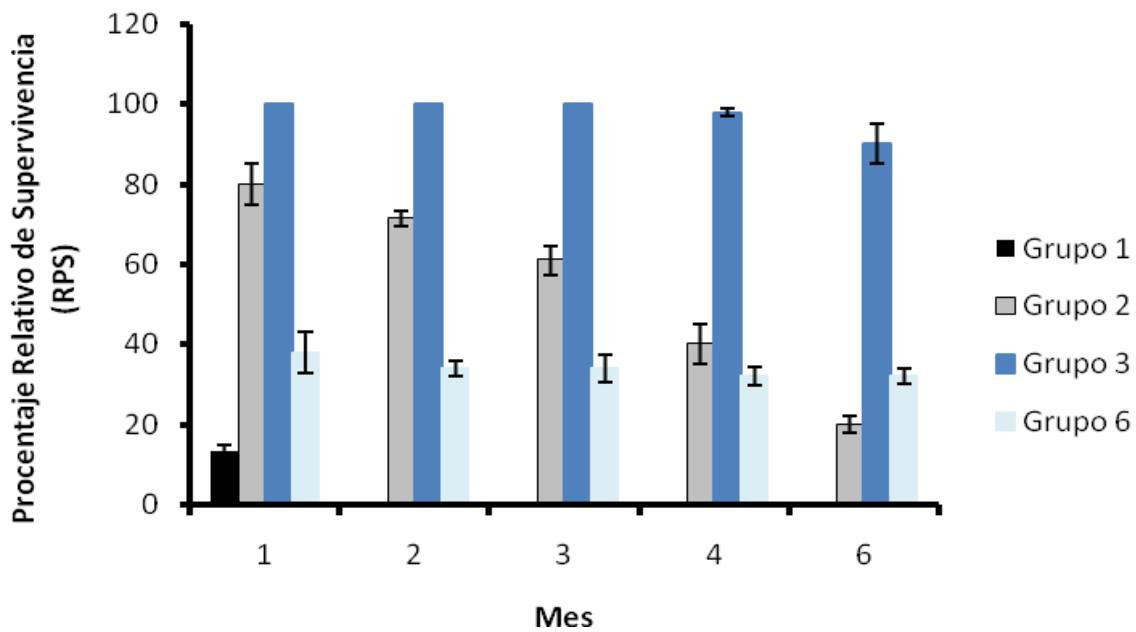


Figura 7.5.- Porcentajes de Supervivencia obtenidos en las diferentes inoculaciones experimentales empleando la cepa ACC35.1. Grupo 1, inmunizado con la vacuna acuosa por baño; Grupo 2, vacunado vía i.p. con la vacuna acuosa; Grupo 3, vacunado vía i.p. con la vacuna adyuvantada; Grupo 6, rodaballos inoculados con una emulsión de adyuvante y SS (70:30 respectivamente). Las barras indican la desviación estándar.

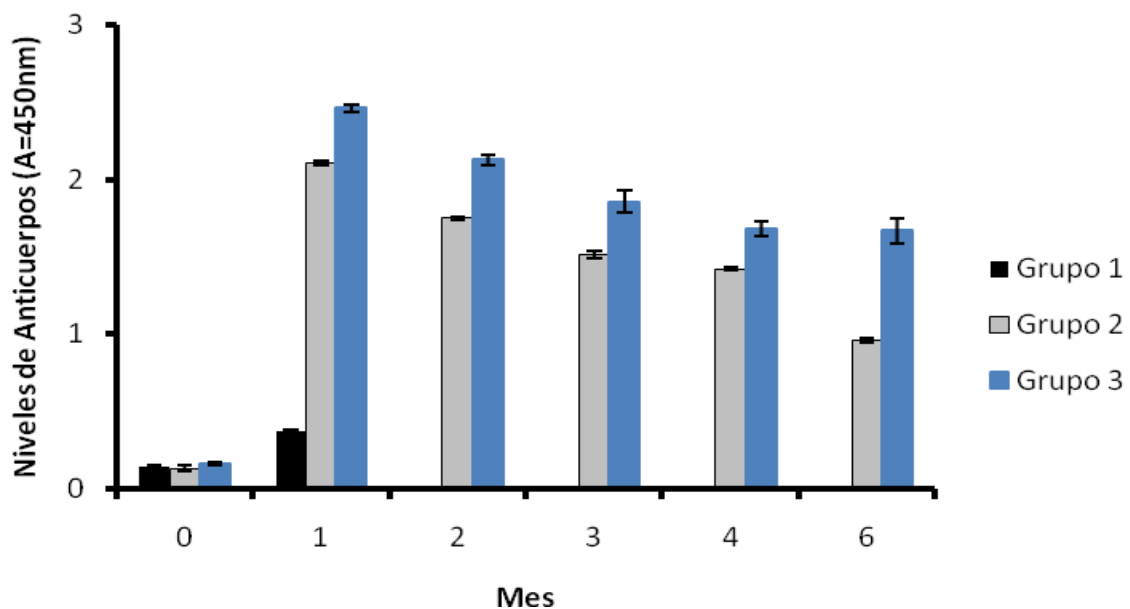


Figura 7.6.- Evolución de los niveles de anticuerpos en rodaballo tras la vacunación con las diferentes formulaciones vacunales. Grupo 1, inmunizado con la vacuna acuosa por baño; Grupo 2, vacunado vía i.p. con la vacuna acuosa; Grupo 3, vacunado vía i.p. con la vacuna adyuvantada. Las barras indican la desviación estándar.

7.4.- DISCUSIÓN

Debido a las importantes pérdidas que *E. tarda* ha causado en la industria acuícola del rodaballo en los últimos años, en el presente trabajo nos planteamos la necesidad de formular una vacuna que permitiese minimizar las mortalidades y evitar el uso de quimioterápicos. Los primeros trabajos sobre vacunación contra *E. tarda* fueron realizados mayoritariamente en anguila japonesa, platija y tilapia. En estas especies se realizaron intentos de formulaciones vacunales empleando principalmente células formolizadas o extractos celulares, si bien, aunque en algunos casos consiguieron obtenerse resultados alentadores de protección contra *E. tarda*, estos datos correspondían a cortos períodos de tiempo post-vacunación, no existiendo datos de protección más allá de 1 mes postvacunación (Salati, 1988).

Más recientemente, se ha estudiado el uso de células vivas atenuadas para la elaboración de vacunas contra *E. tarda* en especies como la tilapia (Igarashi & Iida, 2002; Kwon y col., 2006) o el rodaballo (Lan y col., 2007), pero los resultados aportados en estos estudios mostraban datos de protección, como máximo, a las 4 semanas postvacunación, lo que resultaría insuficiente para la aplicación de la vacuna en la industria acuícola. Asimismo, el empleo de células vivas en la elaboración de vacunas acarrea la existencia de objeciones legales a su aplicación en muchos países.

Hasta la fecha, no existe ninguna vacuna comercial contra la edwardsielosis disponible en el mercado y con buenos resultados de protección frente a la enfermedad en períodos suficientemente largos de tiempo.

El objetivo de este capítulo fue la elaboración de una vacuna contra la *E. tarda* en rodaballo, lo más económica posible de producir, sin objeciones legales a su aplicación y que otorgase a los peces una protección elevada y lo más duradera posible. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que, un mes postvacunación la protección conferida a los peces contra *E. tarda* variaba en función de la vía de administración y el tipo de vacuna empleada. Así, y a pesar de que el sistema de vacunación más económico es la administración de la bacterina vía baño, esta estrategia resultó inefectiva para la protección de los rodaballos contra la edwardsielosis. Sin embargo, cuando la administración de la vacuna se realizaba vía i.p., tanto en el caso de la bacterina, como en el caso de

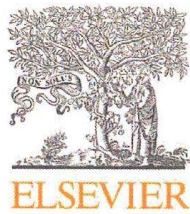
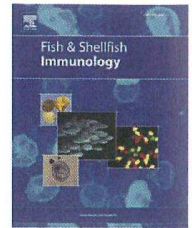
la vacuna adyuvantada, se obtuvieron valores de protección en términos de RPS elevados y los niveles de anticuerpos contra *E. tarda* en suero, también eran significativamente mayores que los correspondientes a los grupos control.

Fue en los ensayos posteriores, a los 2, 3, 4 y 6 meses postvacunación, donde se pudo comprobar que la vacuna adyuvantada aportaba una mayor protección frente al patógeno que la vacuna acuosa. Los valores de RPS para la bacterina descendieron a lo largo del estudio hasta alcanzar niveles demasiado bajos como para poder garantizar la protección frente a la enfermedad. Sin embargo, estos valores en el caso de la vacuna adyuvantada permanecieron por encima del 90% incluso en la última inoculación experimental. Parte de esta protección, se debería al denominado “depot effect” de los aceites empleados como adyuvantes y que liberaría paulatinamente el antígeno en el interior del pez, aumentando y prolongando la respuesta humoral (Schijns & Tangeras, 2005). Se ha descrito que, en muchos casos, la protección frente a ciertos patógenos sólo puede ser conferida cuando a la vacuna se le añade adyuvante y que incluso la inoculación de este adyuvante como único componente puede inducir protección en los peces (Anderson, 1997). De hecho, los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que el adyuvante no mineral confiere a los rodaballos cierta protección frente a *E. tarda* con valores de RPS comprendidos entre el 32% y 38% durante todo el experimento.

A pesar de que también se ha descrito que ciertos adyuvantes pueden causar lesiones internas en los peces y/o disminuir las tasas de crecimiento de los mismos cuando son administrados intraperitonealmente (Midtlyng y col., 1998), estos efectos no se han observado en nuestro estudio a lo largo de los 6 meses que ha durado el mismo.

Serán necesarios futuros estudios para incluir esta vacuna contra *E. tarda* en el calendario vacunal del cultivo del rodaballo, así como la elaboración de vacunas polivalentes que sean capaces de conferir protección frente a los principales patógenos bacterianos que afectan a esta importante especie comercial.

Fish & Shellfish Immunology (2008) 25, 208–212

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/fsi

Development of an effective *Edwardsiella tarda* vaccine for cultured turbot (*Scophthalmus maximus*)

N. Castro*, A.E. Toranzo, S. Núñez, B. Magariños

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Biología-CIBUS and Instituto de Acuicultura, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

Received 10 April 2008; revised 19 May 2008; accepted 21 May 2008
Available online 29 May 2008

KEYWORDS

Edwardsiella tarda;
Turbot;
Vaccination;
Aqueous bacterin;
Oil-based vaccine;
Relative percent survival;
Antibody levels

Abstract Since 2004 *Edwardsiella tarda* has become one of the most important emerging pathogens in turbot aquaculture industry in Europe causing serious economic losses. Therefore, this study aimed to design an effective vaccination strategy to prevent edwardsiellosis in this fish species. Two vaccine formulations, an adjuvanted vaccine and an aqueous bacterin, and different routes of administration, bath and intraperitoneal injection (i.p.), were tested. The effectiveness of the different immunization strategies was evaluated in terms of relative percent survival (RPS) and antibody levels. On the basis of the results obtained we recommend the i.p. administration of a non-mineral oil adjuvanted vaccine via i.p., which confers RPS values over 90% at least 6 months post-vaccination.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Edwardsiella tarda is a Gram negative bacterium of the family *Enterobacteriaceae* described by Ewing et al. in 1965 [1]. *E. tarda* is the causative agent of edwardsiellosis and leads to extensive losses in many commercially important freshwater and marine fish worldwide [2]. From 2004 until now, repeated outbreaks of edwardsiellosis caused by *E. tarda* have occurred in cultured turbot (*Scophthalmus maximus*) in different geographical areas of Europe [3],

being one of the most important emergent diseases in this aquaculture industry.

We have demonstrated that all the *E. tarda* strains isolated from turbot constitute a serological homogeneous group different to those described previously in this fish pathogen [3]. In addition, although the *E. tarda* isolates from turbot possess a high virulence potential, the pathogenic mechanisms remain to be elucidated [4]. Because of this and the drug resistance of *E. tarda* reported worldwide, there is urgent need to find other approaches for the treatment and prevention of turbot edwardsiellosis.

Over the last decade vaccination has become important for the prevention of infectious diseases in farmed fish including turbot. In fact, an effective vaccination program is currently implemented to prevent disease outbreaks in turbot against

* Corresponding author. Tel.: +34 98 156 3100x16914; fax: +34 98 154 7165.

E-mail address: iacobact@usc.es (N. Castro).

pathogens such as *Listonella anguillarum*, *Streptococcus paruberis* and *Tenacibaculum maritimum* [5–7].

With regard to edwardsiellosis, several vaccination attempts have been made to induce protection against *E. tarda* including vaccines comprised of whole cells, disrupted cells, cell extracts and attenuated strains as immunogens [8–11] but the protection efficacy was variable among the studies and the effects of vaccination were insufficient to prevent disease. Moreover, these vaccination studies have been performed mostly in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), eel (*Anguilla japonica*) and tilapia (*Oreochromis* sp.), important species in Asian aquaculture. With regard to turbot, to our knowledge only one study about vaccination against *E. tarda* has been published employing a live vaccine [11], but its use in the field has legal objections in most countries.

In this work, two vaccine formulations and different routes of administration were assayed with the aim to establish the best adequate strategy to prevent edwardsiellosis in cultured turbot.

Materials and methods

Bacterial strains and media

The strain of *E. tarda* ACC35.1 isolated from cultured turbot in South Europe was selected to prepare monovalent vaccines [3]. Following the recommendations of the European Pharmacopeia [12] to test the effectiveness of these vaccines, the homologous and the heterologous *E. tarda* strain 9.8 (isolated from striped bass, *Morone saxatilis*) were included. LD50 values for ACC35.1 and 9.8 strains in turbot were previously calculated (1.6×10^1 and 1.2×10^1 cells/ml respectively) [4].

Cultures were made on Trypticase Soy Agar and in Trypticase Soy Broth (Pronadisa, Madrid, Spain) both supplemented with 1% NaCl (TSA-1 and TSB-1, respectively) and incubated at 25 °C.

Stock cultures were maintained frozen at –80 °C in Criobille tubes (AES Laboratory, Lyon, France).

Vaccine preparation

Two types of vaccines were assayed: an aqueous bacterin and an adjuvanted vaccine. For the preparation of both vaccines the strain ACC35.1 was grown in TSB-1 for 48 h, obtaining a final concentration of 1×10^9 cells/ml.

Bacterial cells were inactivated by adding 1% (v/v) formalin (formaldehyde 36.5–38% w/v, Panreac, Spain) and keeping the cultures at 4 °C overnight.

Vaccine absorbance ($A = 580$ nm) was adjusted to 1 (which represents a concentration of 1×10^9 cells/ml) with sterile saline solution (NaCl at 0.85%) (SS). In the

France), in a ratio of 30:70 respectively to obtain a stable fluid emulsion, following the recommendations of Seppic (France).

Sterility was confirmed by spreading the vaccines on TSA-1 plates and absence of toxicity was tested by the injection of 25 turbot with each vaccine.

Fish vaccination, experimental challenges and measure of the vaccine efficacy

Both vaccines were evaluated in turbot of 12–15 g body weight obtained from a rearing facility in Galicia (Spain). Before vaccination, fish were monitored by bacteriological and serological standard methods [13] in order to confirm the absence of pathogens that could interfere in the experiments. Tank water was continuously aerated with an air-stone and maintained at approximately 17 °C during the experiments.

Fish vaccination was carried out by two administration routes: intraperitoneal injection (i.p.) and bath. In the i.p. immunization experiments, vaccines were administered by injection of 0.1 ml of aqueous or adjuvanted vaccine respectively. In bath immunization procedures, fish were immersed for 60 s with aeration in the aqueous vaccine diluted 1:10 (v/v) with sterile sea water as previously described [14].

Six groups of 250 fish each were employed: group 1 was vaccinated by immersion in the aqueous vaccine; group 2 was vaccinated by i.p. injection with this bacterin; group 3 was i.p. injected with the adjuvanted vaccine; group 4 was immersed for 60 s in SS diluted 1:10 (v/v) with sterile sea water (control of group 1); group 5 was i.p. injected with 0.1 ml of SS (control of groups 2, 3 and 6) and in group 6 the fish were injected with an emulsion of SS and adjuvant (30:70 respectively).

The efficacy of vaccination was confirmed under laboratory conditions by experimental challenges. One month after vaccination three replicas of 10 turbot from each group (vaccinated and not vaccinated), were inoculated by i.p. injection with 0.1 ml of a bacterial suspension of the homologous strain ACC35.1 adjusted to a concentration of 10^4 CFU/ml. In parallel, challenge trials employing the heterologous strain 9.8 were conducted.

Mortalities were monitored for at least 20 days after the first mortality and all dead fish were examined to confirm the reisolation of the inoculated strain from the internal organs (liver and kidney) by streaking directly onto TSA-1 plates. In addition, in order to determine the possible side effects, including organ adhesions caused by the adjuvant, turbot were observed internally.

The potency of the vaccines by the different routes of administration was expressed in terms of the relative percent survival (RPS) [15] using the formula:

$$RPS = \{1 - (\text{vaccinated fish mortality \%} / \text{non-vaccinated mortality \%})\} \times 100\%$$

case of the adjuvanted vaccine, the aqueous bacterin obtained as previously described, was mixed with the non-mineral oil adjuvant Montanide ISA 763 AVG (Seppic,

In the groups in which the protection was $\geq 60\%$ for bath immunization and $\geq 75\%$ in the case of i.p. vaccination following the recommendations of the European

Pharmacopeia [11], the challenge experiments were repeated at 2, 3, 4 and 6 month intervals employing only the homologous strain.

Prior to each challenge, serum-pools (from eight to 10 fish) of each group (vaccinated and unvaccinated fish) were collected in order to measure the antibody levels employing an antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) performed as described [16], employing peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG (Bio-Rad) and an anti-turbot IgM monoclonal antibody (Aquatic Diagnostic Ltd.). The optical density at 492 nm was measured with an ELISA reader (Titertek Multiscan, Flow Laboratories, Lugano, Switzerland).

Moreover, turbot were weighed (30 fish per group) at 0, 1, 3 and 6 months after vaccination to determine the possible influence of vaccination on the growth rate of fish.

Statistical analysis

To evaluate the significance of the differences between results obtained with both vaccines and unvaccinated fish regarding immune response and protection, the Student's *t*-test was used. Values were considered significantly different at *P* values $P < 0.05$.

Results and discussion

Efficacy of vaccines 1 month post-vaccination

In the present work we studied the protection against edwardsiellosis conferred by two different vaccine formulations administered by different routes to turbot. The results obtained in this work showed that 1 month post-vaccination the protection conferred in turbot against *E. tarda* varied depending on the route of administration and type of vaccine. While the most economic system of vaccination is the administration of a bacterin via bath, this strategy was ineffective for the protection of turbot against edwardsiellosis. In fact, the evolution of mortalities of this group and its respective control (group 4) followed a similar kinetics (Fig. 1) resulting in a RPS value of 13.33% at the end of the experimental period (Fig. 3). Moreover, when the ELISA assay was conducted, antibody levels in the turbot's sera of group 1 were 0.350, similar to the group 4 (control group) (Fig. 2). Based on these data, no more experimental challenges were performed with group 1 fish in subsequent months.

In the case of groups 2 and 3, immunized by i.p. with the aqueous bacterin and the adjuvanted vaccine respectively, the highest percent of fish survival was found in the group injected with antigen plus adjuvant with no mortalities registered in this group (Fig. 1) which represents a 100% RPS (Fig. 3). The RPS in the fish receiving adjuvant alone (group 6) was of 38% (Fig. 3).

In the ELISA assay, the antibody levels of these i.p. immunized groups presented values of 2.105 and 2.462 respectively, representing a significant increase with regard to the values displayed by the unvaccinated groups 5 and 6 (Fig. 2).

Although both the aqueous and oil adjuvanted vaccines administered by i.p. conferred high levels of protection in terms of RPS and antibody levels, when these values were

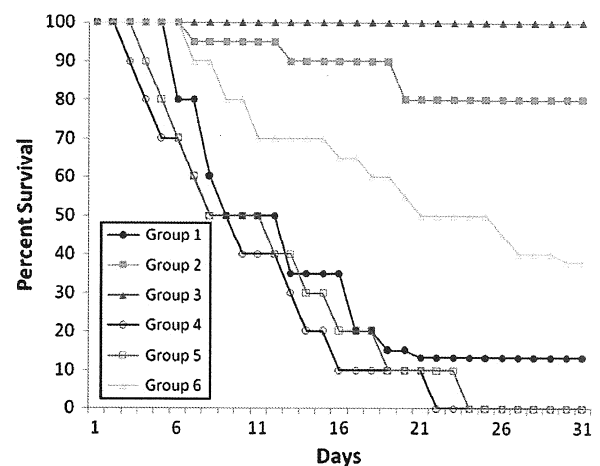


Figure 1 Percent survival obtained in experimental challenge 1 month post-vaccination. Group 1, vaccinated with bacterin by bath; group 2, vaccinated with bacterin i.p.; group 3, vaccinated i.p. with an adjuvanted vaccine; group 4, control fish immersed in SS diluted 1:10 in sea water; group 5, control fish injected i.p. with SS; group 6, fish i.p. injected with an emulsion of SS and adjuvant (30:70 respectively).

statistically analyzed, significant differences ($P < 0.05$) were obtained between both vaccines.

With regard to the challenge experiments employing the heterologous *E. tarda* strain 9.8, similar RPS and antibody level values as those showed to the homologous strain were obtained (data not shown).

Duration of the protection

Four additional experimental challenges at 2, 3, 4 and 6 months post-vaccination were performed to determine

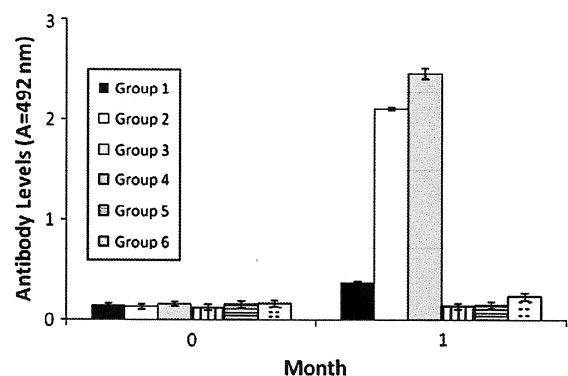


Figure 2 Specific antibody titers in turbot 1 month after vaccination with different vaccines and routes of administration. Group 1, vaccinated with bacterin by bath; group 2, vaccinated with bacterin i.p.; group 3, vaccinated i.p. with an adjuvanted vaccine; group 4, control fish immersed in SS diluted 1:10 in sea water; group 5, control fish injected i.p. with SS; group 6, fish injected i.p. with an emulsion of SS and adjuvant (30:70 respectively). Bars indicate standard deviations.

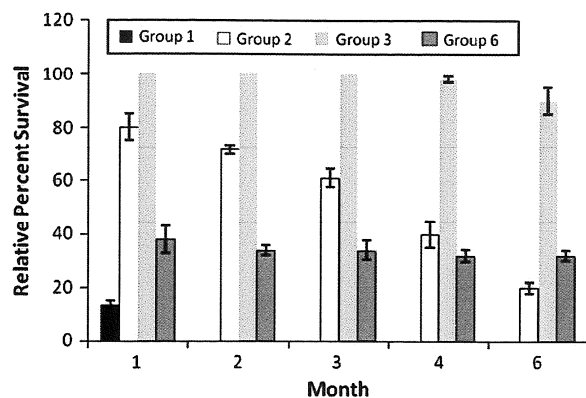


Figure 3 Relative percent survival (RPS) obtained in the different experimental challenges. Group 1, vaccinated with bacterin by bath; group 2, vaccinated with bacterin i.p.; group 3, vaccinated i.p. with an adjuvanted vaccine; group 6, fish i.p. injected with an emulsion of SS and adjuvant (30:70 respectively). Bars indicate standard deviations.

the duration of the protection conferred to turbot i.p. immunized with the two different vaccine formulations. Data obtained in these challenges are presented in Figs. 3 and 4.

Fish vaccinated by i.p. with the aqueous bacterin, showed high levels of RPS (71.5%) at 2 months post-immunization. However, this value decreased in the following challenge experiments. Thus, in month 3 post-vaccination, the RPS value decreased to 61% and was only 20% 6 months post-vaccination (Fig. 3).

In the case of the adjuvanted vaccine, the RPS obtained with this group of turbot revealed that this vaccine conferred a high degree of protection for at least 6 months after its administration. The RPS values were maintained among 90–100% during all the experimental period (Fig. 3). These values are in agreement with those recommended by the European Pharmacopoeia [11].

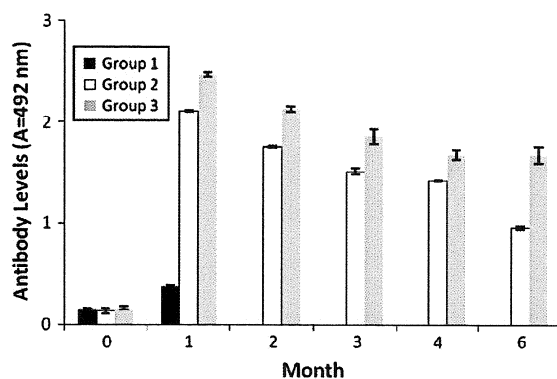


Figure 4 Evolution of specific antibody titers in turbot after vaccination with the different vaccines and routes of administration. Group 1, vaccinated with bacterin by bath; group 2, vaccinated with bacterin i.p.; group 3, vaccinated i.p. with an adjuvanted vaccine. Bars indicate standard deviations.

With regard to the antibody levels in turbot sera, the oil adjuvanted vaccine always displayed statistically significantly ($P < 0.05$) higher values than those obtained with the aqueous bacterin (Fig. 4). Although with both vaccines a progressive decrease in the antibody levels was detected along the experimental period, with the oil adjuvanted vaccine these values remained constant from month 4 (antibody levels around 1.6).

The mechanism of the oil adjuvants is the “depot effect”, which releases the antigen slowly into the tissue or blood, enhancing and prolonging the humoral response [17]. It has been shown that, in many cases, protection against certain fish pathogens only can be observed when the vaccine contains adjuvant and, moreover, that adjuvant alone can induce protection [18]. In fact, the results obtained in our study with group 6 showed that the non-mineral oil adjuvant conferred to turbot some protection against *E. tarda* with RPS values varying from 32 to 38 along the experiment (Fig. 3).

Although it has been shown that certain mineral oil adjuvants can cause internal lesions and/or decreased growth rates when they are administered intraperitoneally [19], these effects were not observed in our study at least during 6 months post-vaccination (data not shown).

In summary, an effective non-mineral oil adjuvanted vaccine against turbot edwardsiellosis was developed which confers levels of protection higher than 90% for at least 6 months post-vaccination. Although this high protection could later decrease gradually with time, it can be assumed that the RPS levels will remain sufficiently high to protect turbot against edwardsiellosis during all the production cycle. In fact, this adjuvanted vaccine is currently being employed by i.p. in a turbot rearing facility as an autovaccine and, to our knowledge, no outbreaks of edwardsiellosis were detected in this farm during the turbot rearing period.

Further studies are being conducted in order to include this *E. tarda* vaccine in the turbot immunization calendar in which other commercial vaccines administered via i.p. are routinely employed [6].

Acknowledgements

This work was supported in part by Programe N° 2006/37 of Consolidation of the Competitive Research Groups, Consellería de Educación y Ordenación Universitaria, Xunta de Galicia.

References

- [1] Ewing WH, McWhorter AC, Escobar MR, Lubin AH. *Edwardsiella* a new genus of *Enterobacteriaceae* based on a new species, *E. tarda*. *Int Bull Bacteriol Nomencl Taxon* 1965;15:33–8.
- [2] Plumb JA. *Edwardsiella septicaemia*. In: Inglis V, Roberts RJ, Bromage NR, editors. *Bacterial diseases of fish*. Oxford, UK: Blackwell Sci Publ; 1993. p. 61–79.
- [3] Castro N, Toranzo AE, Barja JL, Núñez S, Magariños B. Characterization of *Edwardsiella tarda* strains isolated from turbot, *Psetta máxima* (L.) *J Fish Dis* 2006;29:541–7.
- [4] Castro N, Toranzo AE, Núñez S, Peleteiro JB, Magariños B. Patogenicidad de *Edwardsiella tarda* para peces marinos. In: Cerviño A, Guerra A, Pérez C, editors. *Actas XI Congreso Nacional de Acuicultura*: Vigo (Spain); 2007 p. 1033–6.

- [5] Romalde JL, Ravelo C, López-Romalde S, Avendaño R, Magariños B, Toranzo AE. Vaccination strategies to prevent important emerging diseases for Spanish aquaculture. In: Midtlyng PJ, editor. *Fish vaccinology*. Dev Biol, 121. Switzerland: Basel Karger; 2005. p. 85–95.
- [6] Toranzo AE, Santos Y, Barja JL. Immunization with bacterial antigens: *Vibrio* infections. In: Gudding R, Lillehaug A, Midtlyng PJ, Brown F, editors. *Fish vaccinology*. Dev Biol Stand, 90. Switzerland: Karger Basel; 1997. p. 93–106.
- [7] Toranzo AE, Magariños B, Romalde JL. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* 2005;246:37–61.
- [8] Salati F, Kawai K, Kusuda R. Immune response of eel against *Edwardsiella tarda* antigens. *Fish Pathol* 1983;18:135–41.
- [9] Kwon SR, Nam YK, Kim SK, Kim KH. Protection of tilapia (*Oreochromis mosambicus*) from edwardsiellosis by vaccination with *Edwardsiella tarda* ghosts. *Fish Shellfish Immunol* 2006;20:621–6.
- [10] Mekuchi T, Kiyokawa T, Honda K, Nakai T, Muroga K. Vaccination trials in the Japanese flounder against edwardsiellosis. *Fish Pathol* 1995;30:251–6.
- [11] Lan MZ, Peng X, Xiang MY, Xia ZY, Bo W, Jie L, et al. Construction and characterization of a live, attenuated *esrB* mutant of *Edwardsiella tarda* and its potential as a vaccine against the haemorrhagic septicaemia in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) *Fish Shellfish Immunol* 2007;23:521–30.
- [12] European Pharmacopoeia. PA/PH/Exp. 15V/T (95) 37 ANP. Vibriosis vaccine (inactivated) for fish. 4th ed. Strasbourg, France: European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM); 2002. p. 2290–4.
- [13] Thoesen JC. Suggested procedures for the detection and identification of certain finfish and shellfish pathogens. In: *Fish health section*. 4th ed, Version 1. Bethesda, MD, USA: American Fisheries Society; 1994.
- [14] Magariños B, Romalde JL, Santos Y, Casal JF, Barja JL, Toranzo AE. Vaccination trials on gilthead seabream (*Sparus aurata*) against *Pasteurella piscicida*. *Aquaculture* 1994;120:201–8.
- [15] Amend DF. Potency testing of fish vaccines. In: *International symposium on fish biologics: serodiagnosis and vaccines*. Dev Biol Stand 1981;49:447–54.
- [16] Estévez J, Leiro J, Toranzo AE. Role of serum antibodies in protection of vaccinated turbot (*Scophthalmus maximus*) against vibriosis. *Aquaculture* 1994;123:197–204.
- [17] Schijns VEJC, Tangeras A. Vaccine adjuvant-technology: from theoretical mechanism to practical approaches. In: Midtlyng PJ, editor. *Progress in fish vaccinology*. Dev Biol, 121. Switzerland: Karger Basel; 2005. p. 127–34.
- [18] Anderson DP. Adjuvants and immunostimulants for enhancing vaccine potency in fish. In: Gudding R, Lillehaug A, Midtlyng PJ, Brown F, editors. *Fish vaccinology*. Dev Biol Stand, 90. Switzerland: Karger Basel; 1997. p. 257–66.
- [19] Midtlyng PJ, Lillehaug A. Growth of Atlantic salmon *Salmo salar* after intraperitoneal administration of vaccines containing adjuvants. *Dis Aquat Org* 1998;32:91–7.

Sección 8

Consideraciones finales

8.- CONSIDERACIONES FINALES

Edwardsiella tarda es, en la actualidad, uno de los patógenos bacterianos emergentes en acuicultura marina más importante. Aunque, desde su descripción a mediados del s. XX, ha sido aislada a partir diversos organismos (reptiles, peces, mamíferos marinos, anfibios, aves, humanos, ...) su mayor incidencia se da en peces, en donde la edwardsielosis es una de las enfermedades más graves para determinadas especies de importancia comercial como la anguila, el pez gato, la tilapia o la platija, entre otros. Su distribución es mundial, afectando a cultivos tanto de agua dulce como marinos.

El rodaballo es un pez plano marino y una de las especies de peces más apreciadas. La oferta de rodaballo salvaje en el mercado suele ser escasa, debido a la sobreexplotación de la especie y, en parte, a las dificultades que presenta su captura, por sus costumbres imprevisibles y comportamiento poco gregario. La acuicultura se perfila como la mejor alternativa de cara a cubrir la demanda de esta especie, siendo Galicia el principal productor de rodaballo en España y Europa. El cultivo de rodaballo, al igual que cualquier otro cultivo, ve limitada su producción por diversas enfermedades de origen vírico, parasitario o bacteriano. En los últimos años una de las enfermedades más importantes del cultivo de rodaballo en Europa ha sido la edwardsielosis causada por *E. tarda*. El primer aislamiento de *E. tarda* en rodaballo se publicó en el año 1994 (Nougayrede y col., 1994) describiendo una epizootia causada por este patógeno en el Norte de España. No fue hasta más tarde, a finales del año del 2004 y principios del 2005 cuando esta enfermedad comenzó a representar realmente un grave riesgo para la industria del rodaballo. Se produjeron epizootias repetitivas en diferentes puntos geográficos de toda Europa que ocasionaron importantes mortalidades y grandes pérdidas económicas (Castro y col., 2006).

Para poder prevenir una enfermedad bacteriana es imprescindible poseer un amplio conocimiento del patógeno causante. La presente tesis doctoral pretende ampliar el conocimiento de la especie *E. tarda*, centrándonos especialmente en la caracterización fenotípica, serológica y molecular de aquellas cepas aisladas de rodaballo, así como evaluar métodos de diagnóstico y prevención que ayuden a minimizar las mortalidades causadas por la edwardsielosis en estos cultivos.

Los estudios de caracterización fenotípica y bioquímica demostraron que la especie *E. tarda* es altamente homogénea, encontrando únicamente algunas diferencias en la utilización del citrato como única fuente de carbono. Además, el sistema miniaturizado API20E resultó ser una herramienta eficaz para la identificación de la especie. Sin embargo, cuando se realizó la caracterización serológica de las cepas, se comprobó que todos los aislados de rodaballo pertenecían a un mismo serogrupo y que éste era distinto al resto de las cepas estudiadas. Esta información podría llegar a ser de vital importancia a la hora del desarrollo de futuras vacunas y métodos de prevención específicos (y por tanto más eficaces) para la edwardsirosis en rodaballo.

El estudio de la composición de ácidos grasos de las cepas de *E. tarda* reveló que la especie presenta homogeneidad a este nivel. De esta forma, los principales ácidos grasos encontrados fueron comunes en todas las cepas, independientemente de su origen geográfico y de hospedador,. Sin embargo, el análisis de los resultados, también permitió establecer un grupo compacto formado por todos los aislados de rodaballo y que se diferenciaba del resto de cepas estudiadas. Además, se demostró que la composición de ácidos grasos de *E. tarda* depende del medio de cultivo y de la temperatura de incubación, encontrando una mayor variedad de ácidos grasos cuando el medio de cultivo era más rico y cuando la temperatura de incubación era mayor.

Cuando se realizaron estudios de composición proteica de las cepas también se demostró la elevada homogeneidad de la especie. Además, la técnica MALDI-TOF resultó ser una técnica eficaz para la identificación de *E. tarda*.

La caracterización molecular de las cepas reveló una alta diversidad intraespecífica lo que concuerda con estudios anteriores de la especie (Nucci y col., 2002; Maiti y col., 2008 y 2009). Esta heterogeneidad contrastó con la alta homogeneidad observada para los aislados de rodaballo que podría resultar de utilidad a la hora de futuros estudios epidemiológicos de la edwardsirosis en rodaballo. Solamente pudieron encontrarse pequeñas diferencias a nivel molecular dentro de las cepas de rodaballo empleando las técnicas de RAPD (P4 y P5) y REP-PCR.

El análisis del contenido plasmídico mostró la existencia de dos plásmidos de 12 y 2.5 kb en los aislados de rodaballo. El primero, aparecía también en otras cepas con diferentes orígenes, mientras que el segundo parece ser exclusivo de las cepas de rodaballo. Serán necesarios futuros

estudios para caracterizar genéticamente éstos plásmidos y comprobar si juegan un papel importante en la virulencia de los aislados de rodaballo.

En el presente trabajo también se ha demostrado el elevado potencial patógeno de *E. tarda* independientemente de la ruta de inoculación, lo que coincide con otras descripciones anteriores de la especie (Zheng y col., 2004; Xiao y col., 2009). Además, y a pesar de que *E. tarda* fue descrita inicialmente como una especie típica de aguas templadas, los resultados obtenidos indican que es capaz de causar mortalidades incluso a 15°C, influyendo la temperatura en la celeridad de aparición de las mortalidades pero no en su potencial patógeno. Todas las cepas de rodaballo fueron capaces de provocar mortalidades en dos especies de peces de importancia en acuicultura como son el lenguado y la lubina, por lo se demuestra que este grupo de aislados no presentan especificidad de huésped. Por otra parte, los resultados de los experimentos de virulencia empleando ratones demostraron que se trata de aislados con potencial patógeno para homeotermos por lo que se concluye la necesidad de extremar las precauciones de manejo y/o procesado en las plantas de acuicultura.

Los estudios de búsqueda de factores de virulencia realizados parecen indicar que determinadas enzimas de degradación de tejidos como la colagenasa o la condroitinasa o las invasinas, podrían jugar un papel importante en la patogénesis de *E. tarda*. Además, se demostró también que *E. tarda* produce un sideróforo de tipo hidroxamato, lo que podría servir de base para la futura realización de estudios encaminados a la caracterización de los sistemas de captación de hierro en *E. tarda*.

Uno de los pasos más críticos e importantes en el estudio de las enfermedades es la detección del agente causal. En esta tesis evaluamos un medio de cultivo selectivo (ET agar) para el aislamiento de *E. tarda*. Los resultados obtenidos indican que se trata de un medio altamente eficaz para la recuperación de *E. tarda* en cultivo puro a partir de muestras naturales, permitiendo un diagnóstico más rápido de la enfermedad. Por otra parte, este medio de cultivo también podría resultar una herramienta útil en la realización de estudios epidemiológicos de la edwardsielosis.

En cuanto a la evaluación de técnicas de detección basadas en PCR, que permitan una detección del patógeno de una forma más rápida y sensible, en este trabajo se evaluaron cuatro parejas de cebadores para la detección de *E. tarda* por PCR, demostrando que la pareja etfD permite una detección rápida, específica y sensible del patógeno tanto a partir de cultivos bacterianos como de muestras naturales. Además, se desarrolló y avaluó también un protocolo de multiplex-PCR para la detección simultánea de *E. tarda* y *T. maritimum*, dos patógenos de los cultivos de rodaballo y lenguado. La importancia de los patógenos diana, así como los resultados de especificidad y sensibilidad hacen de esta técnica una herramienta de gran utilidad en el diagnóstico de enfermedades en acuicultura.

Los estudios de vacunación en rodaballo demostraron que la administración vía i.p. de la vacuna adyuvantada con aceite no mineral desarrollada en la presente tesis, confiere a los cultivos de rodaballo unos valores de protección superiores al 90% (RPS) a los 6 meses de la vacunación. Estos resultados indican que esta formulación vacunal protegería a los peces durante gran parte de su ciclo de producción, por lo que su administración sería de gran importancia para la prevención de la edwardsielosis en la acuicultura del rodaballo.

Sección 9

Conclusiones

9.- CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral aportan nuevos conocimientos acerca del patógeno de peces *E. tarda* y de la edwardsielosis en rodaballo, que pueden resultar de gran utilidad tanto para el conocimiento general de esta especie bacteriana como a la hora de minimizar las pérdidas que la enfermedad produce en la industria acuícola.

Las conclusiones que podemos extraer de este trabajo son:

- 1) Los aislados procedentes de rodaballo forman un grupo serológico único y distinto al del resto de cepas procedentes de otros orígenes. Además, aunque la composición de ácidos grasos no presenta grandes variaciones dentro de la especie, las cepas de rodaballo forman un grupo compacto y diferenciado del resto de aislados.
- 2) La caracterización molecular de las cepas de rodaballo reveló una alta homogeneidad entre ellas. Solamente pudieron establecerse pequeñas diferencias empleando las técnicas RAPD (cebadores P4 y P5) y REP-PCR. Además, se demostró la presencia de dos plásmidos en los aislados de rodaballo, uno de 12 kb que también está presente en cepas de otros orígenes y otro de 2.5 kb que parece ser exclusivo de este grupo de aislados.
- 3) Los ensayos de virulencia demostraron el alto poder patógeno de *E. tarda* para el rodaballo y la ausencia de especificidad de huésped, siendo capaz de causar mortalidades en otras especies de importancia acuícola como el lenguado y la lubina. Los resultados obtenidos en la determinación de posibles factores de virulencia implicados en la patogénesis de la especie parecen indicar que la virulencia de *E. tarda* pudiera estar relacionada con la presencia de determinadas enzimas de degradación o invasinas.
- 4) La evaluación del medio de cultivo selectivo (ET agar) para el aislamiento de *E. tarda* demostró que puede ser una herramienta útil y eficaz para el diagnóstico de la edwardsielosis así como también para estudios epidemiológicos de la especie. Los dos protocolos de PCR evaluados, uno de ellos específico de *E. tarda* y el otro de Multiplex-PCR junto con *T. maritimum*, resultaron ser altamente específicos y sensibles, permitiendo una

rápida detección del patógeno tanto a partir de cultivos bacterianos como de tejidos de peces.

- 5) Los estudios de vacunación realizados demostraron que la vacuna adyuvantada confiere a los cultivos de rodaballo una elevada protección contra la edwardsielosis durante un período de tiempo superior a los 6 meses cuando es administrada vía i.p., lo que garantiza la protección durante la mayor parte del ciclo de producción de esta especie.**

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Actis LA, Fish W, Crosa JH, Kellerman K, Ellenberger SR, Hauser FM & Sanders-Loehr J (1986) Characterization of anguibactin, a novel siderophore from *Vibrio anguillarum* 775 (pJM1). *Journal of Bacteriology* 167: 57–65.
- Amandi A, Hiu SF, Rohovec JS & Fryer JL (1982) Isolation and characterization of *Edwardsiella tarda* from fall chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Applied and Environmental Microbiology* 43: 1380–1384.
- Amaro C, Aznar R, Alcaide E & Lemos ML (1990) Iron-binding compounds and related outer membrane proteins in *Vibrio cholerae* non-O1 strains from aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 2410-2416.
- Amos KH (1985) Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens. 3rd Fish Health Section, American Fisheries Society, edition. Corvallis, Oregon, USA.
- Anderson DP (1997) Adjuvants and immunoestimulants for enhancing vaccine potency in fish. En: Gudding R, Lillehaug A, Midtlyng PJ, Brown F (Ed) Fish Vaccinology. Developments in Biological Standardization, Switzerland, Kager Basel 90: 257-266.
- Aoki T, Arai T & Egusa S (1977) Detection of R plasmids in naturally occurring fish-pathogenic bacteria *Edwardsiella tarda*. *Microbiology and Immunology* 21: 77-83.
- Aoki T & Holland BI (1985) The outer membrane proteins of the fish pathogens *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* and *Edwardsiella tarda*. *FEMS Microbiology Letters* 27: 299–305.
- Aoki T & Kitao T (1981) Drug resistance and transferable R plasmids in *Edwardsiella tarda* from fish culture ponds. *Fish Pathology* 15: 277-281.

- Aoki T & Takahashi A (1987) Class D tetracycline resistance determinants of R plasmids from the fish pathogens *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda* and *Pasteurella piscicida*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 31: 1278-1280.
- APROMAR (2010). La acuicultura marina de peces en España 2010. Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos.
- Arambulo PV, Westerlund NC, Sarmiento RV & Abaga AS (1967) Isolation of *Edwardsiella tarda*: a new genus of *Enterobacteriaceae* from pig bile in the Philippines. *Far Eastern Medical Journal* 3: 385-386.
- Arnow LE (1937) Colorimetric determination of the components of 3,4-di hydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures. *Journal of Biological Chemistry* 118: 531-537.
- Avendaño-Herrera R, Magariños B, Toranzo AE, Beaz R & Romalde JL (2004) Species-specific polymerase chain reaction primer sets for the diagnosis of *Tenacibaculum maritimum* infection. *Diseases of Aquatic Organisms* 62: 75-83.
- 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.
- Balado M, Osorio CR & Lemos, M.L. (2006) A gene cluster involved in the biosynthesis of vanchrobactin, a chromosome-encoded siderophore produced by *Vibrio anguillarum*. *Microbiology* 152: 3517–3528.
- Baya AM, Romalde JL, Green DE, Navarro RB, Evans J, May EB & Toranzo AE (1997) Edwardsiellosis in wild striped bass from the Chesapeake Bay. *Journal of Wildlife Diseases* 33: 517–525.
- Bolinches J, Lemos ML, Fouz B, Cambra M, Larsen JL & Toranzo AE (1990) Serological relationships among *Vibrio anguillarum* strains. *Journal of Aquatic Animal Health* 2: 21–29.

-
- Bragg RR (1988) First isolation of *Edwardsiella tarda* from fish in South Africa. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 8: 84–88.
 - Brenner DJ, Fanning GR & Steigerwalt AG (1974) Polynucleotide sequence relatedness in *Edwardsiella tarda*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 24: 186-190.
 - Brenner DJ (1977) Characterization and clinical identification of *Enterobacteriaceae* by DNA hybridation. *Progress in Clinical Pathology* 7: 71-117.
 - Brenner DJ (1984) Family *Enterobacteriaceae*. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. N.R. Krieg & J.C. Holt (Ed). Baltimore. The Williams and Wilkins Co. 1: 408-516.
 - Castro N, Toranzo AE, Barja JL, Núñez S & Magariños B (2006) Characterization of *Edwardsiella tarda* strains isolated from turbot. *Journal of Fish Diseases* 29: 541-547.
 - Castro N, Toranzo AE, Núñez S & Magariños B (2008) Development of an effective *Edwardsiella tarda* vaccine for cultured turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish and Shellfish Immunology* 25: 208-212.
 - Castro N, Toranzo AE, Núñez S, Osorio CR & Magariños B (2010) Evaluation of four polymerase chain reaction primer pairs for the detection of *Edwardsiella tarda* in turbot. *Diseases of Aquatic Organisms* 90: 55-61.
 - Castro N, Toranzo AE, Devesa S, González A, Núñez S & Magariños B (2011a) First description of *Edwardsiella tarda* in Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *Journal of Fish Diseases* (aceptado)
 - Castro N, Magariños B, Núñez S, Barja JL & Toranzo AE (2011b) Pathogenic potential of *Edwardsiella tarda* strains isolated from turbot. *Fish Pathology* 46: 27-30.
 - Chang C-I, Wu C-C, Cheng TC, Tsai J-M & Lin K-J (2009) Multiplex nested-polymerase chain reaction for the simultaneous detection of *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*,

Photobacterium damsela and *Streptococcus iniae*, four important fish pathogens in subtropical Asia. *Aquaculture Research* 40: 1182–1190.

- Chen J-D & Lai S-Y (1998) PCR for direct detection of *Edwardsiella tarda* from Infected fish and environmental water by application of the hemolysin gene. *Zoological Studies* 37: 169-176.
- Chowdhury SP, Khanna S, Verma SC & Tripathi AK (2004) Molecular diversity of tannic and degrading bacteria isolated from tannery soil. *Journal of Applied Microbiology* 97: 1210–1219.
- Cipriano RC, Pyle JB, Starliper CE & Pyle SW (1985) Detection of *Vibrio anguillarum* antigen by the dot blot assay. *Journal of Wildlife Diseases* 21: 211-218.
- Clark RB, Lister PD & Janda JM (1991) In vitro susceptibilities of *Edwardsiella tarda* to 22 antibiotics and antibiotic- β -lactamase-inhibitor agents. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 14: 173-175.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2005) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 15th Informational Supplement. M100-S15, Vol. 25 , No. 1. CLSI, Wayne, PA, USA.
- Coles BM, Stroud RK & Sheggeby S (1978) Isolation of *Edwardsiella tarda* from three Oregon sea mammals. *Journal of Wildlife Diseases* 14: 339-341.
- Crosa JH & Hodges LL (1981) Outer membrane proteins induced under conditions of iron limitation in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* 775. *Infection and Immunity* 31: 223–227.
- Csáky TZ (1948) On the estimation of bound hydroxylamine in biological materials. *Acta Chemica Scandinavica* 2: 450-454.

-
- Dhaenens L, Szczebara F, Van Nieuwenhuysse . & Husson MO (1999) Comparison of iron uptake in different *Helicobacter* species. *Research in Microbiology* 150: 475-481.
 - Daily OP, Joseph SW, Coolbaugh JC, Walker RI, Merrel BR, Rollins DM, Seidler RJ, Colwell RR & Lisser CR (1981) Association of *Aeromonas sobria* with human infection. *Journal of Clinical Microbiology* 13: 265-277.
 - Daly JG & Stevenson RMW (1985) Charcoal agar, a new growth medium for the fish disease bacterium *Renibacterium salmoninarum*, *Applied and Environmental Microbiology* 50: 868–871
 - Darwish AM, Newton JC & Plumb JA (2001) Effect of incubation temperature and salinity on expression of the outer membrane protein profile of *Edwardsiella tarda*. *Journal of Aquatic Animal Health* 13: 269–275.
 - Dhaenens L, Szczebara F, Van Nieuwenhuysse S & Husson M-O (1999) Comparison of iron uptake in different *Helicobacter* species. *Research in Microbiology* 150: 475–481.
 - Dice LR (1945) Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology* 26: 297.
 - Doménech A, Fernández-Garayzábal JF, Pascual C, Garcia JA, Cutuli MT, Moreno MA, Collins MD & Dominguez L. (1996) Streptococcosis in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), associated with *Streptococcus parauberis*. *Journal of Fish Diseases* 19: 33–38
 - Eaves LE, Ketterer PJ, Anderson IG & Beumer JP (1990) The isolation and identification of *Edwardsiella tarda* from a diseased native Australian eel *Anguilla reinhardtii*. *Australian Veterinary Journal* 67: 336-337.
 - Edwards U, Rogall T, Blocker H, Emde M & Bottger EC (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research* 17: 7843–7853.

- Esteve C, Herraiz S & Alcaide E (2006) Occurrence of *Edwardsiella tarda* in wild European eels *Anguilla anguilla* from Mediterranean Spain. *Diseases of Aquatic Organisms* 73: 77–81.
- Estévez J, Leiro J & Toranzo AE (1994) Role of serum antibodies in protection of vaccinated turbot (*Scophthalmus maximus*) against vibriosis. *Aquaculture* 123: 197-204.
- European Pharmacopoeia (2002) PA/PH/Exp. 15V/T (95) 37 ANP. Vibriosis vaccine (inactivated) for fish. In: *European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM)* (4th ed.), Strasbourg, France 2290–2294.
- Ewing WH, McWhorther AC, Escobar MR & Lubin AH (1965) *Edwardsiella*, a new genus of *Enterobacteriaceae* based on a new species, *E. tarda*. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy* 15: 233-38.
- FAO (2010). Examen mundial de la pesca y la acuicultura. En: *El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura 2010*.
- Farmer JJ, Brenner DJ & Clarck WA (1976) Proposal to conserve the specific epithet *tarda* over the specific epithet *anguillimortiferum* in the name of the organism presently know as *Edwardsiella tarda*: Request for an Opinion. *International Journal of Systematic Bacteriology* 26: 293-294.
- Farmer JJ & McWorther AC (1984) Genus *Edwardsiella* Ewing & McWorther 1965. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Kreig N.R. & Holt J.G. (Ed) Williams & Wilkins, Baltimore. 1: 436-491.
- Filip C, Fletcher G, Wulff JL & Earhart CF (1973) Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium-lauryl sarcosinate. *The Journal of Bacteriology* 115: 717-722.
- Grimont PAD, Grimont F, Richard C & Sakazaki R (1980) *Edwardsiella hoshinae*, a new species of *Enterobacteriaceae*. *Current Microbiology* 4: 347-351.

-
- Grogan DW & Cronan Jr JE (1997) Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61: 429-441.
 - Han H-J, Kim D-H, Lee D-C, Kim S-M & Park S-I (2006) Pathogenicity of *Edwardsiella tarda* to olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck and Schlegel). *Journal of Fish Diseases* 29: 601–609.
 - Han Y, Li X, Qi Z, Zhang X-H & Bossier P (2010) Detection of different quorum-sensing signal molecules in a virulent *Edwardsiella tarda* strain LTB-4. *Journal of Applied Microbiology* 108: 139–147.
 - Hawke JP, McWhosther AC, Steigerwalt AG & Brenner DJ (1981) *Edwardsiella ictaluri* sp. nov., the causative agent of enteric septicemia of catfish. *International Journal of Systematic Bacteriology* 31: 396-440.
 - Herman RL & Bullock GL (1986) Pathology caused by the bacterium *Edwardsiella tarda* in striped bass. *Transaction of the American Fisheries Society* 115: 232-235.
 - 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.
 - Hirono I, Tange N & Aoki T (1997) Iron-regulated haemolysin gene from *Edwardsiella tarda*. *Molecular Microbiology* 24: 851–856.
 - Hitchcock PJ & Brown TM (1983) Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *Journal of Bacteriology* 154: 269-277.
 - Horenstein S, Smolowitz R, Uhlinger K & Roberts S (2004) Diagnosis of *Edwardsiella tarda* infection in oyster toadfish (*Opsanus tau*) held at the Marine Resources Center. *Biology Bulletin Woods Hole Massachusetts* 207: 171.

- Hoshina T (1962) On a new bacterium, *Paracolobactrum anguillimortiferum* sp. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 28: 162-164.
- Hudson L & Hay F (1991) *Practical Immunology*. 3rd. ed., Blackwell Scientific Publications. London.
- Hulton CJS, Higgins CF & Sharp PM (1991) ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Molecular Microbiology* 5: 825–834.
- Igarashi A & Iida T (2002a) A vaccination trial using live cells of *Edwardsiella tarda* in tilapia. *Fish Pathology* 37: 145–148.
- Igarashi A, Iida T & Crosa JH (2002b) Iron-acquisition ability of *Edwardsiella tarda* with involvement in its virulence. *Fish Pathology* 37: 53-57.
- Janda JM, Abbott SL, Kroske-Bystrom S, Cheung WK, Powers C, Kokka RP & Tamura K (1991) Pathogenic properties of *Edwardsiella* species. *Journal of Clinical Microbiology* 29: 1997–2001.
- Janda JM & Abbott SL (1993a) Infections associated with the genus *Edwardsiella*: the role of *Edwardsiella tarda* in human disease. *Clinical Infectious Diseases* 17: 742–74.
- Janda JM & Abbott SL (1993b) Expression of an iron-regulated hemolysin by *Edwardsiella tarda*. *FEMS Microbiology Letters* 111: 275–280.
- Janda JM & Abbott SL (1998) *The enterobacteria*. Lippincott-Raven. PA.
- Janda JM & Abbott SL (2006) *The Enterobacteria* (2nd ed.) Washington, DC: ASM Press pp. 411.
- Jin Jun L, Bum Jeong J, Huh M-D, Chung J-K, Choi D-I, Lee C-H & Jeong HD (2004) Detection of tetracycline-resistance determinants by multiplex polymerase chain reaction in *Edwardsiella tarda* isolated from fish farms in Korea. *Aquaculture* 240: 89-100.

-
- Jostensen JP & Landfald B (1996) Influence of growth conditions on fatty acid composition of a polyunsaturated fatty acid producing *Vibrio* species. *Archives of Microbiology* 165: 306–310.
 - Kalina GP, Moiseenko NN & Kabanova TP (1981) Reptiles, the chief reservoir of *Edwardsiella* in nature. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* 7: 93-99.
 - Kim K, Wang X, Choi S, Park G, Koo J & Bai SC (2003) No synergistic effects by the dietary supplementation of ascorbic acid, alpha-tocopheryl acetate and selenium on the growth performance and challenge test of *Edwardsiella tarda* in fingerling Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture Research* 34: 1053–1058.
 - King BM & Adler DL (1964) A previously undescribed group of *Enterobacteriaceae*. *American Journal of Clinical Pathology* 41: 230-232.
 - Kokubo T, Iida T & Wakabayashi H (1990) Production of siderophore by *Edwardsiella tarda*. *Fish Pathology*. 17: 243–256.
 - Koshi G & Lalitha MK (1976) *Edwardsiella tarda* in a variety of human infections. *Indian Journal of Medical Research* 64: 1753-1759.
 - Kubota S, Kaige N, Miyazaki T & Miyashita T (1981) Histopathological studies on edwardsiellosis of tilapia. En: Natural infection, *Bulletin of the Faculty of Fisheries, Mie University* 9: 155–165.
 - Kusuda R, Toyoshima T, Iwamura Y & Sako H (1976) *Edwardsiella tarda* from an epizootic of mullets (*Mugil cephalus*) in Okitsu bay. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish* 42: 271–275.
 - Kwon SR, Nam YK, Kim SK & Kim KH (2006) Protection of tilapia (*Oreochromis mosambicus*) from edwardsiellosis by vaccination with *Edwardsiella tarda* ghosts. *Fish and Shellfish Immunology* 20: 621–626.

- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lan J, Zhang XH, Wang Y, Chen J & Han Y (2008) Isolation of an unusual strain of *Edwardsiella tarda* from turbot and establish a PCR detection technique with the *gyrB* gene. *Journal of Applied Microbiology* 105: 644-651.
- Lan M-Z, Peng X, Xiang M-Y, Xia Z-Y, Bo W, Jie L, Li X-Y & Jun Z-P (2007) Construction and characterization of a live, attenuated *esrB* mutant of *Edwardsiella tarda* and its potential as a vaccine against the haemorrhagic septicaemia in turbot, *Scophthamus maximus* (L.) *Fish and Shellfish Immunology* 23: 521-530.
- Lechevalier MP (1977) Lipids in bacterial taxonomy - a taxonomist's view. *Critical Reviews in Microbiology* 5: 109-210.
- Leung MJ (1996) *Plesiomonas shigelloides* and sucrose-positive *Edwardsiella tarda* bacteremia in a man with obstructive jaundice. *Pathology* 28: 68-69.
- Lindquist JA (1991) Medium and procedure for the direct, selective isolation of *Edwardsiella tarda* from environmental water samples. *Abstracts of the annual meeting of the American Society for Microbiology* C-303 p. 302.
- Ling SHM, Wang XH, Xie L, Lim TM & Leung KY (2000) Use of green fluorescent protein (GFP) to track the invasive pathways of *Edwardsiella tarda* in the in vivo and in vitro fish models. *Microbiology* 146: 7-19.
- Magariños B, Romalde JL, Santos Y, Casal JF, Barja JL & Toranzo AE (1994) Vaccination trial on gilthead seabream (*Sparus aurata*) against *Pasteurella piscicida*. *Aquaculture* 120: 201-208.
- Magariños B, Toranzo AE, Barja JL & Romalde JL (2000) Existence of two geographically-linked clonal lineages in the bacterial fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* evidence by random amplified polymorphic DNA analysis. *Epidemiology and Infection* 125: 213-219.

-
- Magariños B, Romalde JL, Moriñigo MA & Toranzo AE (2003) Pathobiological characterization of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* strains isolated from cultured sole (*Solea senegalensis*). *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* 23: 183-190.
 - Maiti NK, Mondal A, Mohanty S & Samanta M (2008) Comparative analysis of genome of *Edwardsiella tarda* by BOX-PCR and PCR-ribotyping. *Aquaculture* 280: 60-63.
 - Maiti NK, Mandal A, Mohanty S & Mandal RN (2009) Phenotypic and genetic characterization of *Edwardsiella tarda* isolated from pond sediments. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 32: 1-8.
 - Makela PH & Mayer H (1976) Enterobacterial Common Antigen. *Bacteriological Reviews* 40: 591-632.
 - Marques RM, Toledo MRF, Silva NP, Magalhães M & Trabulsi LR (1984) Invasion of Hela cells by *Edwardsiella tarda*. *Current Microbiology* 10: 129–133.
 - Martin JD (1984) Atlantic salmon and alewife passage through a pool and weir fishway of the Magaguadavic River, New Brunswick, Canada during 1983. Abstract. *Canadian Manuscript Report of Fisheries Aquatic Sciences*.
 - Matsuyama T, Kamaishi T & Ooseko N (2005) Pathogenicity of motile and non-motile *Edwardsiella tarda* to some marine fish. *Fish Pathology* 40: 13- 135.
 - McFaddin JF (1983) Biochemical test for identification of medical bacteria. 2nd edition. Williams & Wilkins, Baltimore, USA.
 - McWhorter AC, Ewing WH & Sakazaki R (1967) A Provisional Antigenic Schema for *Edwardsiella* *Bacteriology Procedures* 89.
 - Meyer EP & Bullock GL (1973) *Edwardsiella tarda*, a new pathogen of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Applied Microbiology* 25: 155-156.

- Midtlying PJ & Lillehaug A (1998) Growth of Atlantic salmon *Salmo salar* after intraperitoneal administration of vaccines containing adjuvants. *Diseases of Aquatic Organism* 32: 91-97.
- Midtlying PJ (Ed) (2005) Progress in fish vaccinology. Developments in Biologicals. Karger-Basel. Vol 121.
- Mohanty BR & Sahoo PK (2007) Edwardsiellosis in fish: a brief review. *Journal of Biosciences* 32(7): 1331–1344.
- Morohoshi T, Inaba T, Kato N, Kanai K & Ikeda T (2004) Identification of quorum-sensing signal molecules and the LuxRI homologs in fish pathogen *Edwardsiella tarda*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 98(4): 274-281.
- Muyembe T, Vandepitte J & Desmyter J (1973) Natural colistin resistance in *Edwardsiella tarda*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 4(5): 521-524.
- Najiah M, Lee SW & Lee KL (2006) Phenotypic characterization and numerical analysis of *Edwardsiella tarda* in wild asian swamp eel, *Monopterus albus* in Terengganu. *Journal of Sustainability Science and Management* 1: 85-91
- Naka H, Lopez CS & Crosa JH (2008) Reactivation of the vanchrobactin siderophore system of *Vibrio anguillarum* by removal of a chromosomal insertion sequence originated in plasmid pJM1 encoding the anguibactin siderophore system. *Environmental Microbiology* 10: 265–277.
- Nakatsugawa T (1983) *Edwardsiella tarda* isolated from cultured young flounder. *Fish Pathology* 18: 99–101.
- Nougayrede Ph, Vuillaume A, Vigneulle M, Faivre B, Luengo S & Delprat J (1994) First isolation of *Edwardsiella tarda* from diseased turbot (*Scophthalmus maximus*) reared in a sea farm in the Bay of Biscay. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 14: 128–129.

-
- Nucci C, da Silveira WD, da Silva Corrêa S, Nakazato G, Bando SY, Ribeiro MA, Pestana de Castro AF (2002) Microbiological comparative study of isolates of *Edwardsiella tarda* isolated in different countries from fish and humans. *Veterinary Microbiology* 89: 29-39.
 - O'Hici B, Olivier G, Powell R (2000) Genetic diversity of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* demonstrated by random amplified polymorphic DNA and pulsed-field gel electrophoresis analyses. *Diseases of Aquatic Organisms* 39: 109–119.
 - Ootsubo M, Shimizu T, Tanaka R, Sawabe T, Tajima K, Yoshimizu M, Ezura Y, Ezaki T & Oyaizu H (2002) Oligonucleotide probe for detecting *Enterobacteriaceae* by in situ hybridization. *Journal of Applied Microbiology* 93: 60–68.
 - Osorio CR, Collins MD, Toranzo AE, Barja JL & Romalde JL (1999) 16S rRNA gene sequence analysis of *Photobacterium damsela* and nested PCR method for rapid detection of the causative agent of fish pasteurellosis. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2942–2946.
 - Osorio CR, Romalde JL, Barja JL & Toranzo AE (2000a) Presence of phospholipase-D (dly) gene coding for damselysin production is not a pre-requisite for pathogenicity in *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Microbial Pathogenesis* 28: 119–126.
 - Osorio CR, Toranzo AE, Romalde JL & Barja JL (2000b) Multiplex PCR assay for *ureC* and 16S rRNA genes clearly discriminates between both subspecies of *Photobacterium damsela*. *Diseases of Aquatic Organisms* 40: 177–183.
 - Panangala VS, Shoemaker CA, McNulty ST, Arias CR & Klesius PH (2006) Intra- and interspecific phenotypic characteristics fish-pathogenic *Edwardsiella ictaluri* and *E. tarda*. *Aquaculture Research* 37: 49-60.
 - Park S, Wakabayashi H & Watanabe Y (1983) Serotype and virulence of *Edwardsiella tarda* isolated from eel and their environment. *Fish Pathology* 18: 85-89.

- Pazos F, Santos Y, Macias AR, Nuñez S & Toranzo AE (1996) Evaluation of media for the successful culture of *Flexibacter maritimus*. *Journal of Fish Diseases* 19: 193-197.
- Pirarat N, Kobayashi T, Katagiri T, Maita M & Endo M (2006) Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 113: 339–347.
- Plumb JA (1999) *Edwardsiella* septicemias. En: Woo P.T.K. and Bruno D.W. (Ed.), *Fish Diseases and Disorders, Vol 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections*. Blackwell Scientific Publication, Oxford, 61–79.
- Rashid MM, Honda K, Nakai T & Muroga K (1994) An ecological study of *Edwardsiella tarda* in flounder farms. *Fish Pathology* 29: 221-227.
- Rakovsky J & Aldova E (1965) Isolation of strains of the new *Enterobacteriaceae* group "Bartholomew" in Cuba. *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology* 9: 112.
- Reed LJ & Muench H (1938) A simple method of estimating fifty percent endpoints. *The American Journal of Hygiene* 27: 493-497.
- Reger PJ, Mockler DF & Miller MA (1993) Comparison of antimicrobial susceptibility, β -lactamase production, plasmid analysis and serum bactericidal activity in *Edwardsiella tarda*, *E. ictaluri* and *E. hoshinae*. *Journal of Medical Microbiology* 39: 273-281.
- Reinhardt JF, Fowlston S, Jones J & George WL (1985) Comparative in vitro activities of selected antimicrobial agents against *Edwardsiella tarda*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 27: 966-967.
- Rogers W.A. (1981) Serological detection of two species of *Edwardsiella* infecting catfish. En: International symposium on fish biologics: serodiagnostics and vaccines. *Developments in Biological Standardization* 49: 169–172.

-
- Romalde JL, Magariños B, Barja JL & Toranzo AE (1993) Antigenic and molecular characterization of *Yersinia ruckeri*. Proposal for a new intraspecies classification. *Systematic and Applied Microbiology* 16: 411-419.
 - Romalde JL, Magariños B, Villar C, Barja JL & Toranzo AE (1999) Genetic analysis of turbot pathogenic *Streptococcus parauberis* strains by ribotyping and random amplified polymorphic DNA. *FEMS Microbiology Letters* 459: 297–304.
 - Romalde JL, López-Romalde S, Ravelo C, Magariños B & Toranzo AE (2004) Development and validation of a PCR-based protocol for the detection of *Pseudomonas anguilliseptica*. *Fish Pathology* 39: 33-41.
 - Sae-Oui D, Muroga K & Nakai T (1984) A case of *Edwardsiella tarda* infection in cultured colored *Cyprinus carpio*. *Fish Pathology* 19: 197–199.
 - Sahoo PK & Mukherjee SC (1997) In-vitro susceptibility of three bacterial pathogens of catfish to 23 antimicrobial agents. *Indian Journal of Fisheries* 44: 393–397.
 - Sahoo PK & Mukherjee SC (2002) The effect of dietary immunomodulation upon *Edwardsiella tarda* vaccination in healthy and immunocompromised Indian major carp (*Labeo rohita*). *Fish and Shellfish Immunology* 12: 1–16.
 - Sahoo PK, Mukherjee SC & Sahoo SK (1998) *Aeromonas hydrophila* versus *Edwardsiella tarda*: A pathoanatomical study in *Clarias batrachus*. *Journal of Aquaculture* 6: 57-66.
 - Sahoo PK, Swain P, Sahoo SK, Mukherjee SC & Sahu AK (2000) Pathology caused by the bacterium *Edwardsiella tarda* in *Anabas testudineus* (Bloch). *Asian Fisheries Science* 13: 357-362.
 - Sakai T, Iida T, Osatomi K & Kanai K (2007) Detection of type 1 fimbrial genes in fish pathogenic and non-pathogenic *Edwardsiella tarda* strains by PCR. *Fish Pathology* 42: 115-117.

- Sakazaki R (1967) Studies on the Asakusa group of *Enterobacteriaceae* (*Edwardsiella tarda*). *Japanese Journal of Medical Science & Biology* 20: 205-212.
- Sakazaki R & Murata Y (1962) The new group of the *Enterobacteriaceae*, the Asakusa group. *Japanese Journal of Bacteriology* 17: 617-618.
- Sakazaki R & Tamura K (1975) Priority of the specific epithet *anguillimortiferum* over the specific epithet *tarda* in the name of the organism presently known as *Edwardsiella tarda*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 25: 219-220.
- Sakazaki R & Tamura K (1991) The genus *Edwardsiella*. En: Balows A., Trüper H.G., Dworkin M., Harder W. and Schleifer K.H. (Ed) *The Prokaryotes* 2nd ed. Springer-Verlag, Berlin 2737-2743.
- Salamah AA & Ali MA (1995) Effect of temperature on the lipid and fatty acid composition of *Yersinia pseudotuberculosis*. *The new Microbiologica* 18: 27-33.
- Salati F (1988) Vaccination against *Edwardsiella tarda*. En: Ellis A.E. (Ed) *Fish Vaccination*. Academic Press, London 135–151.
- Savan R, Kono T, Itami T & Sakai M (2005) Loop-mediated isothermal amplification: an emerging technology for detection of fish and shellfish pathogens. *Journal of Fish Diseases* 28: 573–581.
- Scherer C, Müller K-D, Rath P-M & Ansorg R. (2003) Influence of culture conditions on the fatty acid profiles of laboratory-adapted and freshly isolated strains of *Helicobacter pylori* *Journal of Clinical Microbiology* 41: 1114-1117.
- Schijns VEJC & Tangeras A (2005) Vaccine adjuvant-technology. Theoretical mechanism to practical approaches. En: *Progress in Fish Vaccinology. Developments in Biologicals*. Switzerland. Kager Basel. 121: 127-134.

- Schwyn B & Neilands JB (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 160: 47-56.
- Shotts EB & Cooper RK (1992) Chondroitinase attenuated *Edwardsiella ictaluri* and a vaccine for prevention of enteric septicemia (ES) in fish. United States Patent 5536658
- Skerman VBD, McGowan V & Sneath PHA (Ed) (1980) Approved Lists of Bacterial Names. *International Journal of Systematic Bacteriology* 30: 225-420.
- Sørensen UBS & Larsen JL (1986) Serotyping of *Vibrio anguillarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 51: 593-597.
- Srinivasa Rao PS, Yamada Y & Leung KY (2003) A major catalase (KatB) that is required for resistance to H₂O₂ and phagocyte mediated killing in *Edwardsiella tarda*. *Microbiology* 149: 2635–2644.
- Stead DE (1992) Grouping of plant-pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. by using cellular fatty acid profiles. *International Journal of Systematic Bacteriology* 24:281-295.
- Stern MJ, Ames FL, Smith NH, Robinson EC & Higgins CF (1984) Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell* 37: 1015–1026.
- Stevenson RMW & Daly JG (1982) Biochemical and serological characteristics of Ontario isolates of *Yersinia ruckeri*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 39: 870-876.
- Stîngu CS, Rodloff AC, Jentsch H, Schaumann R & Eschrich K (2008) Rapid identification of oral anaerobic bacteria cultivated from subgingival biofilm by MALDI-TOF-MS. *Oral Microbiology and Immunology* 23: 372-376.

- Strauss EJ, Ghori N & Falkow S (1997) An *Edwardsiella tarda* strain containing a mutation in a gene with homology to *sglB* and *hpmB* is defective for entry into epithelial cells in culture. *Infection and Immunity* 65: 3924–3932.
- Supamataya M (1988) The study of diseases in sand goby (*Oxyleotris marmoratus* Bleeker) in cage culture and some environmental factors related to infection. (Abstract) Kasetsart University, Bangkok, Thailand.
- Tamura K, Sakazaki R, McWhorter AC & Kosako Y (1988) *Edwardsiella tarda* serotyping scheme for international use. *Journal of Clinical Microbiology* 26: 2343–2346.
- Tan YP, Lin Q, Wang XH, Joshi S, Hew CL & Leung KY (2002) Comparative proteomic analysis of extracellular proteins of *Edwardsiella tarda*. *Infection and Immunity* 70: 6475–6480.
- Tan YP, Zheng J, Tung SL, Rosenshine I, Leung KY (2005) Role of type III secretion in *Edwardsiella tarda* virulence. *Microbiology* 151: 2301–2313.
- Taoka Y, Maeda H, Jo J-Y, Kim S-M, Park S-I, Yoshikawa & Sakata T (2006) Use of live and dead probiotic cells in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish Science* 72: 755–766.
- Thoesen JC (1994) Suggested procedures for the detection and identification of certain finfish and shellfish pathogens. Fish Health Section, American Fisheries Society, 4th edition, version 1. Bethesda, Maryland, USA.
- Toranzo AE (2007) Enfermedades bacterianas emergentes en cultivos marinos de Peces. Actas del XI Congreso Nacional de Acuicultura. Vigo.
- Toranzo AE, Barja JL, Potter SA, Colwell RR, Hetrick FM & Crosa JH (1983) Molecular factors associated with the virulence of marine vibrios isolated from striped bass in Chesapeake Bay. *Infection and Immunity* 39: 1220–1227.

-
- Toranzo AE, Baya A, Roberson BS, Barja JL, Grimes DJ & Hetrick FM (1987) Specificity of slide agglutination test for detecting bacterial fish pathogens. *Aquaculture* 61: 81-97.

 - Toranzo AE & Barja JL (1990) A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the northwest of Spain. *Diseases of Aquatic Organisms* 9: 73-82.

 - Toranzo AE & Barja JL (1992) First report of furunculosis in turbot reared in floating cages in northwest of Spain. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 12: 147– 149.

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

 - Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 4350-4354.

 - 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.

 - Tu X & Kawai K (1998) Isolation and characterization of major outer membrane proteins of *Edwardsiella tarda*. *Fish Pathology* 33: 481–487

 - Uhland FC, Hélie P & Higgins R (2000) Infections of *Edwardsiella tarda* among Brook Trout in Quebec. *Journal of Aquatic Animal Health* 12: 74-77.

 - Van Damme LR & Vandepitte J (1980) Frequent isolation of *Edwardsiella tarda* and *Plesiomonas shigelloides* from healthy Zaires fresh water fish: a possible source of sporadic diarrhea in the tropic. *Applied and Environmental Microbiology* 39: 457-479.

- Vandepitte J, Lemmens P & de Swert L (1983) Human edwardsiellosis traced to ornamental fish. *Journal of Clinical Microbiology* 17: 156–167.

- Versalovic J, Koeuth T & Lupski JR (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 19: 6823–6831.

- Vinogradov E, Nossova L, Perry MB, Kay WW (2005) Structural characterization of the O-polysaccharide antigen of *Edwardsiella tarda* MT 108. *Carbohydrate Research* 345: 85–90.

- Vladik P, Prouza A & Vítovec J (1983) Finding of the bacterial species *Edwardsiella tarda* in the aquarium fish *Betta splendens*. *Veterinary Medicine* 28: 249-254.

- Wakabayashi H & Egusa S (1973) *Edwardsiella tarda* (*Paracolobactrum anguillmortiferum*) associated with pond-cultured eel disease. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 39: 931–936.

- Wallace LJ, White FH & Gore HL (1966) Isolation of *Edwardsiella tarda* from a sea lion and two alligators. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 149: 881-883.

- Waltman WD, Shotts EB & Hsu TC (1986) Biochemical characteristics of *Edwardsiella ictaluri*. *Applied and Environmental Microbiology* 51: 101–104.

- Walton DT, Abbot SL & Janda JM (1993) Sucrose positive *Edwardsiella tarda* mimicking a biogroup 1 strain isolated from a patient with cholelithiasis. *Journal of Clinical Microbiology* 31: 155–156.

- Wang B, Mo ZL, Xiao P, Li J, Zou YX, Hao B & Li G-Y (2010) EseD, a putative T3SS translocon component of *Edwardsiella tarda*, contributes to virulence in fish and is a candidate for vaccine development. *Marine Biotechnology* 12: 678-685.

- Wang Q, Yang M, Xiao J, Wu H, Wang X, Lv Y, Xu L, Zheng H, Wang S, Zhao G, Liu Q & Zhang Y (2009) Genome sequence of the versatile fish pathogen *Edwardsiella tarda* provides insights into its adaptation to broad host ranges and intracellular niches. *PLoS ONE* 4: 1-16.

-
- Wang Y, Zhang X, Lu J, Xu Z, Chen J & Han Y (2009) Isolation of *Edwardsiella tarda* from diseased turbot (*Scophthalmus maximus*) and vaccination against *Edwardsiella tarda*. *Journal of Fisheries Sciences of China* 2009-03.
 - Wang Y, Zhang XH & Austin B (2010) Comparative analysis of the phenotypic characteristics of high- and low-virulent strains of *Edwardsiella tarda*. *Journal of Fish Diseases* 33: 985–994.
 - Wang Z, Mai K, Kangsen M, Liufu Z, Ma H, Xu W, Ai Q, Zhang W, Tan B & Wang X (2006) Effect of high dietary intakes of vitamin E and n-3 HUFA on immune responses and resistance to *Edwardsiella tarda* challenge in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*, Temminck and Schlegel). *Aquaculture Research* 37: 681–692.
 - Wei LS, Musa N & Wee W (2008) Reviews on phenotypes of *Edwardsiella tarda* in fish [OL]. http://www.paper.edu.cn/index.php/default/en_releasepaper/content/22329
 - White FH, Neal FC, Simpson CF & Walsh AF (1969) Isolation of *Edwardsiella tarda* from an ostrich and an Australian skink. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 155: 1057-1058.
 - White FH, Simpson CF & Williams LE JR (1973) Isolation of *Edwardsiella tarda* from aquatic animal species and surface waters in Florida. *Journal of Wildlife Diseases* 9: 204-208.
 - Wyatt LE, Nickelson R & Vanderzant C (1979) *Edwardsiella tarda* in fresh water catfish and their environment. *Applied and Environmental Microbiology* 38: 710-714.
 - Xiao JF, Wang QY, Liu Q, Wang X, Liu H & Zhang Y (2009) Isolation and identification of fish pathogen *Edwardsiella tarda* from mariculture in China. *Aquaculture Research* 40: 13–17.
 - Yamada Y & Wakabayashi H (1999) Identification of fish pathogenic strains belonging to genus *Edwardsiella* by sequence analysis of sodB. *Fish Pathology* 34: 145–150.

- Yasunaga N, Ogawa S & Hatai K (1982) Characteristics of the fish pathogen *Edwardsiella* isolated from several species of cultured marine fishes. *Bulletin of Nagasaki Prefectural Institute of Fisheries* 8: 57-65.
- Yu L, Yuan L, Feng H & Li SF (2004) Determination of the bacterial pathogen *Edwardsiella tarda* in fish species by capillary electrophoresis with blue light-emitting diode-induced fluorescence. *Electrophoresis* 25: 3139–3144.
- Zhang X-J, Fang H, Chen C-Z, Ge M-X & Wang X-Y (2005) Sensitivity of pathogenic *Edwardsiella tarda* isolated from flounder (*Paralichthys olivaceus*) to some antimicrobial agents. *Fish Science* 24: 15–18.
- Zhang M, Sun K & Sun L (2008) Regulation of autoinducer 2 production and *luxS* expression in a pathogenic *Edwardsiella tarda* strain. *Microbiology* 154: 2060-2069.
- Zheng D, Mai K, Liu S, Cao L, Liufu Z, Xu W, Tan B & Zhang W (2004) Effect of temperature and salinity on virulence of *Edwardsiella tarda* to Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquaculture Research* 35: 494–500
- Zheng J, Tung SL & Leung KY (2005) Regulation of a type III and a putative secretion system in *Edwardsiella tarda* by EsrC is under the control of a two-component system, EsrA-EsrB. *Infection and Immunity* 73: 4127–4137.
- Zhu Z-C, Shi X-G, Zhang S-J, Jiang G-J, Xing Z-B, Zhao Y-L, Li Z-J & Wu P (2006) The pathogenic bacteria of the ascites in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Science* 7: 325–329.

Edwardsiella tarda es un patógeno bacteriano que puede afectar a gran variedad de organismos entre los que se incluye el hombre. Aunque la edwardsielosis en peces es conocida desde mediados del s. XX, su incidencia se restringía mayoritariamente a zonas de aguas cálidas y predominaba en especies como la anguila, tilapia, platija, etc... No ha sido hasta hace pocos años cuando *E. tarda* se ha convertido en uno de los principales patógenos en el cultivo del rodaballo, causando graves pérdidas económicas. En la presente tesis doctoral, se ha realizado una amplia caracterización de cepas de *E. tarda* aisladas de rodaballo a nivel fenotípico, bioquímico, serológico y molecular. Además, se ha estudiado el potencial patógeno de estos aislados tanto para distintas especies de peces de importancia comercial, como para homeotermos por el posible riesgo de salud pública que pudiera representar esta bacteria. Por último, se han evaluado y desarrollado técnicas de diagnóstico y prevención de la edwardsielosis que permitan minimizar las pérdidas que ocasiona esta enfermedad.

Edwardsiella tarda is a bacterial pathogen that could affect a variety of organisms including humans. Although edwardsiellosis is well-known since mid of the 20th century, its impact was limited mostly to warm waters fish species like eel, tilapia, flounder, ... Few years ago, *E. tarda* has become in one of the most important pathogens in turbot aquaculture, causing serious economic losses. In this doctoral dissertation a wide phenotypical, biochemical, serological and molecular characterization of *E. tarda* strains isolated from turbot was performed. Moreover, we studied the pathogenic potential of these strains not only for different fish species with important commercial value but also for mammals to determine the possible risk factor of this bacterium to public health. Finally, we evaluated and developed diagnosis and prevention techniques of edwardsiellosis in order to minimize the losses produced by this disease.

Edwardsiella tarda это бактериальный патоген который может воздействовать на различные организмы включая людей. Хотя edwardsielosis в рыбах был обнаружен ещё в середине XX века, его распространение ограничивалось главным образом в теплых водах и преобладало в таких видах как, морской угорь, камбала, тилапия..... Всего несколько лет назад, когда *E. tarda* становится одним из главных патогеном в рыбо производстве тюрбо, принося большие экономические потери. В этой докторской диссертации была проделана расширенная характеристика штамм *E. tarda* изолированных из тюрбо и анализированных на уровне: фенотипа, биохимии, серологии и молекуляр. Также изучили возможный патоген этих изолированных штамм, как для различных видов рыб имеющих важное коммерческое значение, так и для млекопитающих из-за возможного риска для здоровья людей которую может предоставлять эта бактерия. Также проанализировали и разработали технику диагностики и предохранения от edwardsielosis, что позволяет свести к минимуму экономические потери связанные с этим заболеванием.