

Caracterización del Patógeno Emergente
en Acuicultura Marina
Pseudomonas anguilliseptica.



Sonia López Romalde

Julio 2005



Departamento de Microbiología y Parasitología

FACULTAD DE BIOLOGIA

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO

*Caracterización del Patógeno
Emergente en Acuicultura Marina
Pseudomonas anguilliseptica.*

Sonia López Romalde

2005



**Departamento de Microbiología y Parasitología.
Facultad de Biología.
Universidad de Santiago de Compostela.**

**CARACTERIZACION DEL PATOGENO
EMERGENTE EN ACUICULTURA MARINA**
Pseudomonas anguilliseptica.

**Memoria que presenta
Sonia López Romalde
para optar al grado de
Doctor en Ciencias Biológicas**

**Fdo: Sonia López Romalde
Santiago de Compostela, Abril 2005.**



**Departamento de Microbiología y Parasitología.
Facultad de Biología.
Universidad de Santiago de Compostela.**

Jesús López Romalde, Profesor Titular, y **Alicia Estévez Toranzo**,
Catedrático, del Departamento de Microbiología y Parasitología de la
Universidad de Santiago de Compostela

Informan: que la presente Tesis Doctoral titulada: “**Caracterización del patgeno emergente en Acuicultura Marina *Pseudomonas anguilliseptica*.**” que presenta **Sonia López Romalde** para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, ha sido realizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología bajo nuestra dirección, y considerando que se haya concluída, autorizamos su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente

En Santiago de Compostela, a 28 de Abril de 2005

Dr. Jesús L. Romalde.

Dra. Alicia E. Toranzo



Juan José Borrego García, Catedrático del Departamento de Microbiología
de la Universidad de Málaga

Informa: que parte de la presente Tesis Doctoral titulada:
“Caracterización del patógeno emergente en Acuicultura Marina *Pseudomonas anguilliseptica*.” que presenta **Sonia López Romalde** para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de esta Universidad bajo mi dirección, y considerando que se haya concluída, autorizo su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente

En Málaga, a 28 de Abril de 2005

Dr. Juan J. Borrego.

Este trabajo fue posible gracias a una subvención del Programa Nacional de Alimentación (INIA-CICYT) mediante el proyecto de investigación ACU01-012.

Durante el desarrollo del mismo, he disfrutado de dos contratos asignados a los proyecto PGIDT02-RMA06E y AGL2003-09307-C02.

Quiero mostrar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido a hacer posible este trabajo:

A la Dra. Alicia Estévez Toranzo y al Dr. Jesús López Romalde por su importante labor como directores de la presente Tesis Doctoral, por su constante interés, así como por la ayuda, tanto moral como práctica, recibida a lo largo de estos años en la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Juan José Borrego, por sus valiosos consejos y sugerencias plasmadas en buena parte de este trabajo. Sin olvidar el recibimiento tan cariñoso que me hizo sentir como en casa desde el primer día de mi llegada a Málaga.

Al Dr. Juan Luis Barja, por la colaboración e interés mostrado durante el desarrollo del trabajo experimental que constituye la presente Tesis Doctoral.

A la Dra. Beatriz Magariños, por su continua motivación y grandes consejos (pa`tó), allanándome siempre el camino y demostrándome tantas veces su apoyo, tanto dentro como fuera del laboratorio.

A Sol por haberme guiado en mis primeros pasos de la patología microbiana (y por seguir haciéndolo todavía).

A mis niños del laboratorio: Manu, Roxana, Susana, Celsa, Sabela y Mari (et al.) por ser más que compañeros, amigos. En especial a mi "Dotorsita" Carmen Ravelo por todo lo compartido en "aquellos maravillosos años", por ayudarme a conseguir uno de mis sueños, estimulándome día a día y enseñándome a afrontar los problemas con una sonrisa (bueno, eso no lo tengo del todo dominado).

A mis compis de Málaga por su hospitalidad y apoyo durante los últimos meses de la realización de este trabajo.

A mis amigos, por haber hecho tan especial esta etapa de mi vida. Espero que los reencuentros sigan siendo tan ansiados por todos como hasta ahora.

A mis padres y hermanos porque gracias a su confianza, cariño y apoyo incondicional he podido llegar hasta aquí. Especialmente a Jesús por soportar estoicamente todos mis cambios de humor, "nerviosismos" y dudas, en definitiva por ser "sufridor en casa".

A Rafa (mi ...), gracias por todo, sin tí esto hubiese sido mucho más duro.

A mis padres

RESUMEN

RESUMEN

La pseudomonadiosis producida por *Pseudomonas anguilliseptica* está considerada como una de las principales enfermedades emergentes para el cultivo de los peces marinos. Aunque esta bacteria ya se conocía de antiguo por causar septicemia hemorrágica en anguilas, no es hasta 1997 cuando se demuestra que *P. anguilliseptica* es el agente causal de la patología conocida como “Winter disease” o enfermedad de invierno en dorada. Más recientemente se ha descrito en rodaballo, tanto en Francia como en España y en besugo cultivado en España.

La caracterización bioquímica y fisiológica de las cepas de *P. anguilliseptica* asociadas a mortalidades de dorada, rodaballo y besugo en distintas áreas geográficas españolas, demostró que los aislados incluidos en el estudio presentaron una gran homogeneidad en sus propiedades fenotípicas y que las pocas diferencias observadas no pudieron ser relacionadas con el origen de los aislados. Por otro lado, los sistemas miniaturizados API 20 NE y API ZYM resultaron de utilidad para la identificación rápida del microorganismo siempre y cuando se empleasen inóculos obtenidos bajo condiciones optimizadas (uso de agar sangre y concentración ajustada a una DO de 1 [A₅₈₀]).

Los estudios serológicos realizados mediante técnicas de aglutinación, microaglutinación y “dot-blot”, mostraron la existencia de dos grupos antigénicos distintos dentro de los aislados de *P. anguilliseptica*. El análisis del patrón de los lipopolisacáridos demostró que dichos grupos eran debidos a diferencias en el antígeno somático (antígeno O termoestables) y, en base a ello, se propuso un esquema de serotipado con dos serotipos O. Estos serotipos presentan utilidad potencial para estudios epidemiológicos.

Por otro lado, se ha observado una gran homología entre las cepas en sus perfiles proteicos, tanto de proteínas totales como de membrana externa, así como en sus características antigénicas. Esto indica que las proteínas no participan en la diferenciación de los dos grupos serológicos dentro de la especie *P. anguilliseptica*.

El estudio de caracterización genética de los aislados de *P. anguilliseptica* mediante técnicas basadas en la PCR (RAPD, ERIC-PCR y REP-PCR) reveló la existencia de variabilidad genética intraespecífica. En general, las técnicas de ERIC- y REP-PCR resultaron ser más discriminativas, permitiendo el establecimiento de tres grupos genéticos. Estos resultados son de una gran importancia en los estudios epidemiológicos ya que las cepas de los distintos grupos pueden ser relacionados con distintos hospedadores.

Las cepas de *P. anguilliseptica* que se mostraron virulentas en el ensayo realizado en rodaballos no presentaron especificidad de huesped. Sin embargo, el análisis realizado de los factores de virulencia, tanto celulares como extracelulares, demostró que de las características de superficie celular estudiadas, únicamente pudieron ser relacionados con la virulencia la presencia de cápsula y de hemaglutininas, ya que *P. anguilliseptica* no presentó las capacidades de hidrofobicidad, adherencia o invasividad. Además, en el estudio de los ECP extraídos de las cepas de *P. anguilliseptica* no se observaron actividades enzimáticas ni citotóxicas que pudieran ser relacionadas con la virulencia de este microorganismo. Por otro lado, ninguno de los ECP resultó tóxico para alevines de rodaballo.

La identificación de *P. anguilliseptica* mediante técnicas convencionales es difícil debido a su lento crecimiento y baja reactividad en la mayoría de las pruebas bioquímicas utilizadas en la identificación bacteriana. Por eso era necesario el desarrollo de métodos de PCR rápidos y específicos para la detección e identificación de este patógeno. Tanto el protocolo de PCR convencional como el de PCR en tiempo real desarrollados en este trabajo, mostraron una gran especificidad y sensibilidad, demostrándose su aplicabilidad en tejidos de peces procedentes tanto de casos de sintomáticos de enfermedad como de muestreos rutinarios de peces asintomáticos. Por tanto, pueden ser de gran utilidad para el diagnóstico de la pseudomonadiosis de peces. La principal ventaja de la PCR en tiempo real es la de permitir la cuantificación de microorganismos en las muestras.

El presente trabajo contempló además como objetivo el desarrollo de un protocolo de vacunación contra la pseudomonadiosis causada por *P. anguilliseptica*. La formulación vacunal, elaborada con representantes de los dos serotipos del patógeno, es altamente efectiva en su forma acuosa cuando la inmunización se realiza por vía intraperitoneal. La incorporación del adyuvante oleoso no mineral AQUAMUM[®] parece aumentar la duración de la inmunización, y permitió la protección de ejemplares de dorada, con valores de RPS superiores al 95%, durante toda la temporada de invierno.

SUMMARY

Pseudomonadiosis, caused by *Pseudomonas anguilliseptica*, is considered one of the major emerging diseases in the marine fish culture. Although this bacterium was old known as cause of hemorrhagic septicemia in eel, only in 1997 *P. anguilliseptica* was described as etiological agent of the winter disease in gilthead seabream. More recently it has been detected in turbot, both in France and Spain, and in black spot seabream cultured in Spain.

Biochemical and physiological characterization of *P. anguilliseptica* strains associated with gilthead and black spot seabream as well as turbot in different Spanish regions, demonstrated that the isolates included in this study showed a great homogeneity in their phenotypic properties. Only a few differences were observed, but they could not be related with the origin of the isolates. On the other hand, miniaturized systems API 20NE and API ZYM proved to be useful for the rapid identification of the pathogen only if inocula obtained under optimized conditions (from blood agar and adjusted to OD of 1 at 580 nm) were employed.

Serological studies using agglutination and dot-blot techniques showed the existence of two distinct antigenic groups within *P. anguilliseptica*. Analysis of LPS demonstrated that such groups were due to differences in the somatic antigens (thermostable O antigen) and, therefore, a serotyping scheme with two O serotypes was proposed. These serotypes have potential usefulness for epidemiological studies.

On the other hand, a great homology was observed among the isolates in the profiles of total and outer membrane proteins, as well as in their antigenicity. These facts indicate that proteins are not involved in the differentiation of the serological groups within *P. anguilliseptica*.

Genetic characterization of the *P. anguilliseptica* strains using PCR-based techniques (RAPD, ERIC-PCR and REP-PCR) revealed the existence of intraspecific genetic variability. In general, ERIC- and REP-PCR procedures were more discriminative, allowing the establishment of three genetic groups. These results can be of importance for epidemiological purposes since the different groups could be related with the distinct host of origin.

Virulent *P. anguilliseptica* strains showed no host specificity in the pathogenicity assays. However, the analysis of the virulence factors, both cellular and extracellular, showed that, of the cell surface characteristics studied, only the presence of capsular material and the hemagglutinating activity could be related with virulence, since *P. anguilliseptica* did not possess hydrophobic, adherent or invasive capacities. On the other hand, in the ECP of *P. anguilliseptica* strains no enzymatic or cytotoxic activities that could be associated with virulence were detected. Moreover, ECP were not toxic for turbot fingerlings.

Identification of *P. anguilliseptica* by classical techniques is difficult due to its slow growth and unreactivity in most biochemical tests used for bacterial identification. Therefore, the development of rapid and specific PCR procedures for the detection of this fish pathogen was an urgent need. Both conventional and real time PCR protocols developed in this work showed a great specificity and sensitivity, demonstrating their usefulness for detection of *P. anguilliseptica* in fish tissues from both symptomatic and asymptomatic fish. Therefore, these protocols can be a great help for the diagnosis of fish pseudomonadiosis. The main advantage of the real time PCR is that quantification of the microorganism in the samples can be made.

This work included also as one of its objectives the development of a vaccination program against fish pseudomonadiosis. Vaccine formulation, including representatives of the two serotypes described in this fish pathogen, was highly effective even as aqueous bacterin when i.p. administered. The inclusion of the non-mineral oil adjuvant AQUAMUM® seems to prolong the duration of immunization, achieving the protection of gilthead seabream, with RPS higher than 95%, for all the winter season.

PUBLICACIONES

Relación de publicaciones y patentes derivadas de la presente tesis doctoral

La investigación desarrollada durante la realización de esta Tesis Doctoral ha originado una patente nacional y varios artículos publicados en revistas internacionales, que se relacionan a continuación:

Artículos

López-Romalde, S., Magariños, B., Núñez, S., Toranzo, A.E. & Romalde, J.L. 2003a. Phenotypic and genetic characterization of *Pseudomonas anguilliseptica* strains isolated from fish. *J. Aquat. Anim. Health* **15**: 39-7.

López-Romalde, S., Magariños, B., Ravelo, C., Toranzo, A.E. & Romalde, J.L. 2003b. Existence of two O-serotypes in the fish pathogen *Pseudomonas anguilliseptica*. *Vet. Microbiol.* **94**: 325-333.

López-Romalde, S., Núñez, S., Toranzo, A.E. & Romalde, J.L. 2003c. Black spot seabream (*Pagellus bogaraveo*), a new susceptible host for *Pseudomonas anguilliseptica*. *Bull. of the Eur. Assoc. of fish Path.* **26**: 258-264.

Romalde, J.L., **López-Romalde, S.**, Ravelo, C., Magariños, B. & Toranzo, A.E. 2003. Evidences of two clonal lineages within the emerging fish pathogen *Pseudomonas anguilliseptica* by serological and genetics techniques. *AFS/FHS Newsletter* **31**: 8-9.

Romalde, J.L., **López-Romalde, S.**, Ravelo, C., Magariños, B. & Toranzo, A.E. 2004. Development of a PCR-based protocol for the detection of *Pseudomonas anguilliseptica*. *Fish Pathol.* **39**: 33-41.

Romalde, J.L., Ravelo, C., **López-Romalde, S.**, Avendaño, R., Magariños, B. & Toranzo, A.E. 2005. Vaccination Strategies to Prevent Important Diseases for Spanish Aquaculture. En: *Progress in Fish Vaccinology*. P.J. Midtlyng, T. Wolffrom & F. Brown (eds) Ed. Karger. Basel. (Suiza).

Patente

Protocolo de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para detección e identificación de *Pseudomonas anguilliseptica* a partir de cultivos puros del microorganismo y de tejidos de peces. Ref: P200302511.

Inventores: Jesús L. Romalde, **Sonia López-Romalde** & Alicia Estévez Toranzo.

Institución: Universidad de Santiago de Compostela

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1.- La Acuicultura: Generalidades	3
1.1.- <i>La Acuicultura en España</i>	3
1.2.- <i>Factores condicionantes en la Acuicultura</i>	4
2.- Representantes de la familia <i>Pseudomonadaceae</i> patógenas para peces	8
3.- Pseudomonadiasis por <i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	10
3.1.- <i>Características de P. anguilliseptica</i>	10
3.2.- <i>Variabilidad dentro de los especie P. anguilliseptica</i>	10
a) Estudios serológicos	10
b) Estudios moleculares	11
3.3.- <i>Distribución geográfica y rango de hospedadores</i>	12
3.4.- <i>Síntomas clínicos</i>	14
3.5.- <i>Epizootiología</i>	14
4.- <i>Factores de virulencia</i>	15
4.1.- <i>Grado de virulencia</i>	17
4.2.- <i>Factores de virulencia en P. anguilliseptica</i>	18
5.- Sistemas de detección	18
6.- Tratamiento y vacunación	22
II. OBJETIVOS	25
III. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA, SEROLÓGICA Y MOLECULAR DE <i>P. anguilliseptica</i>.	29
MATERIAL Y METODOS	31
1.- Cepas bacterianas: origen y conservación	31
2.- Caracterización bioquímica y fisiológica de los aislados	32
2.1.- <i>Caracterización convencional en tubo y placa</i>	32
2.2.- <i>Sistemas miniaturizados: API 20NE y API ZYM</i>	38
3.- Sensibilidad a antibióticos y agentes quimioterápicos	39
4.- Caracterización serológica	39
4.1.- <i>Obtención de antisueros</i>	39
4.2.- <i>Métodos serológicos</i>	41
4.2.1.- <i>Aglutinación en portaobjetos</i>	41
4.2.2.- <i>Ensayos de microtitulación</i>	41
4.2.3.- <i>Ensayo “Dot-blot”</i>	42
5.- Estudio de los componentes de la envoltura celular	43
5.1.- <i>Análisis de Lipopolisacáridos (LPS)</i>	43
5.2.- <i>Análisis de proteínas de membrana externa y totales</i>	43
5.3.- <i>Electroforesis</i>	44
5.4.- <i>Transferencia electroforética a membrana de nitrocelulosa y “Western-blot” de lipopolisacáridos y proteínas</i>	45
6.- Caracterización molecular. Estudio de la variabilidad intraespecífica existente en los aislados de <i>P. anguilliseptica</i>	46
6.1.- <i>Análisis de plásmidos</i>	46

6.2.- <i>RAPD</i>	48
6.2.1.- <i>Extracción de DNA</i>	48
6.2.2.- <i>Selección de cebadores</i>	48
6.3.- <i>ERIC y REP-PCR</i>	50
RESULTADOS	52
1.- Caracterización bioquímica	53
2.- Análisis por los sistemas API 20 NE y API ZYM	53
3.- Patrón de resistencia a agentes antimicrobianos	55
4.- Caracterización serológica	55
4.1.- <i>Ensayos de aglutinación en portaobjetos</i>	55
4.2.- <i>Microtitulación</i>	56
4.3.- <i>“Dot-blot”</i>	62
4.4.- <i>Patrón de lipopolisacáridos</i>	62
4.5.- <i>Análisis de proteínas totales y de membrana externa</i>	67
5.- Caracterización molecular	67
5.1.- <i>Estudio del contenido plasmídico</i>	67
5.2.- <i>Análisis por RAPD</i>	72
5.3.- <i>Análisis por ERIC-PCR y REP-PCR</i>	74
IV. DETECCIÓN DE <i>P. anguilliseptica</i> POR TÉCNICAS DE PCR	79
MATERIAL Y MÉTODOS	81
1.- Desarrollo de un protocolo específico para la detección de <i>P.anguilliseptica</i>	81
1.1.- <i>Cepas utilizadas</i>	81
1.2.- <i>Extracción de DNA</i>	83
1.3.- <i>Selección de cebadores</i>	83
1.4.- <i>Optimización del método</i>	83
1.5.- <i>Especificidad y sensibilidad de la PCR</i>	84
1.6.- <i>Aplicabilidad en tejidos</i>	85
1.7.- <i>Aplicabilidad del método a muestras naturales</i>	86
2.- PCR en tiempo real	88
2.1.- <i>Extracción de DNA</i>	88
2.2.- <i>Optimización del método</i>	88
2.3.- <i>Especificidad y sensibilidad</i>	89
2.4.- <i>Aplicabilidad a tejidos</i>	90
RESULTADOS	91
1.- Optimización de la reacción PCR convencional	91
2.- Especificidad de los cebadores y sensibilidad de la PCR	92
3.- Aplicación a tejidos de pez	92
4.- Aplicación del método a muestras naturales	98
5.- Optimización de la rt-PCR	98
6.- Especificidad y sensibilidad del método	100
7.- Aplicación a tejidos de pez	102

V. PATOGENICIDAD Y FACTORES DE VIRULENCIA	105
MATERIAL Y MÉTODOS	107
1.- Cepas bacterianas. Ensayos de virulencia	107
2.- Características asociadas a la superficie celular	108
2.1.- <i>Detección del material capsular</i>	108
2.2.- <i>Ensayos de hidrofobicidad. Adherencia bacteriana a hidrocarburos</i>	108
2.3.- <i>Estudio de la actividad hemaglutinante</i>	109
2.4.- <i>Ensayos de inhibición de la actividad hemaglutinante</i>	110
3.- Adherencia e invasividad	111
3.1.- <i>Ensayos de adherencia</i>	111
3.2.- <i>Capacidad invasiva</i>	112
4.- Estudio de los factores de virulencia extracelulares	113
4.1.- <i>Obtención de productos extracelulares</i>	113
4.2.- <i>Caracterización de las actividades enzimáticas de los ECP “in vitro”</i>	114
4.3.- <i>Cálculo de los niveles de proteínas y lipopolisacáridos en los productos extracelulares</i>	116
4.4.- <i>Análisis en geles de poliacrilamida-SDS y transferencia electroforética (“Western-blot”)</i>	116
4.5.- <i>Citotoxicidad</i>	117
4.6.- <i>Toxicidad de los productos extracelulares “in vivo”</i>	117
RESULTADOS	118
1.- Estudio del grado de virulencia	118
2.- Características de la superficie celular	119
2.1.- <i>Detección de estructuras celulares</i>	119
2.2.- <i>Ensayos de hidrofobicidad</i>	120
2.3.- <i>Hemaglutinación</i>	120
2.4.- <i>Adherencia e invasividad</i>	121
3.- Estudio de los factores extracelulares	121
3.1.- <i>Influencia del método de extracción y del medio de cultivo en la obtención de los ECP</i>	121
3.2.- <i>Composición y actividades enzimáticas y citotoxicidad de los ECP</i>	124
3.3.- <i>Análisis de los componentes proteicos y LPS de los ECP</i>	125
3.4.- <i>Evaluación de la toxicidad de los productos extracelulares “in vivo”.</i>	132
VI. INMUNOPROFILAXIS DE <i>P. anguilliseptica</i>	133
MATERIAL Y MÉTODOS	135
1.- Ensayos de vacunación por vía intraperitoneal (vacunas acuosa y vacunas adyuvantada)	135
1.1.- <i>Vacunas acuosas</i>	135
1.2.- <i>Vacunas adyuvantadas</i>	136

<i>1.3.- Análisis estadístico</i>	137
RESULTADOS	139
1.- Ensayos de inmunización con vacunas administradas por vía intraperitoneal (i.p.)	139
VII. DISCUSIÓN	143
VIII. CONCLUSIONES	159
IX. BIBLIOGRAFÍA	163

ABREVIATURAS

AS	Agar sangre
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
BATH	Adherencia Bacteriana a Hidrocarburos
BBL	Agar urea base
bp	Pares de bases
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
Ct	Ciclo umbral (“Treshold cycle”)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
DSMZ	Colección Alemana de Microorganismo y Cultivos Celulares
ECP	Productos extracelulares
fg	Fentogramos
FSB	Tampón marcador
FPBS	Tampón fosfato salino + formol
LD ₅₀	Dosis letal 50
LPS	Lipopolisacáridos
M	Concentración molar
mA	Miliamperios
MB	Medio basal
MDa	Megadaltos
mg	Miligramos
MHA	Agar Mueller-Hinton
min	Minutos
ml	mililitros
μl	microlitros
mV	milivoltios
NA	Agar nutritivo
NCIMB	Colección Nacional de Bacterias Industriales y Marinas
Ng	nanogramos
nm	nanómetros
ONPG	β-galactosidasa
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RAPD	Amplificación alatoria de DNA
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida
SS	Solución salina
TAE	Tampón acetato-EDTA
TBS	Tampón Tris-salino
TSA-1	Agar de soja y tripticaseína 1% de NaCl
TSC-1	caldo de soja y tripticaseína 1% de NaCl
TTBS	TBS + Tween 20
VP	Voges-Proskauer

I. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCION

1. La Acuicultura: Generalidades

La Acuicultura es una de las actividades productivas más innovadoras emprendidas por el hombre en la segunda mitad del siglo XX. Según datos de la FAO, la producción de la Acuicultura a nivel mundial en 2001 ya superaba los 37,9 millones de toneladas, lo que representa el 40% del total obtenido por capturas de pesca para consumo humano (FAO, 2004).

Cabe esperar que el sector de la Acuicultura siga creciendo, si bien a un ritmo que disminuirá con el tiempo, a medida que los recursos y mercados se saturen y se reduzcan las posibilidades de expansión. El crecimiento de la producción se conseguirá mejorando los rendimientos, así como la infraestructura acuícola.

1.1. La Acuicultura en España

Como consecuencia de la constatada explotación de los recursos naturales, la Acuicultura representa la principal opción para asegurar en un futuro el suministro de pescado para el consumo humano.

España es actualmente una potencia en Acuicultura en Europa, pero para poder mantener su posición e incrementar los recursos que genera se deben optimizar las unidades de producción mediante la aplicación de nuevos estudios sobre economía de empresa, mejora genética, nutrición y control de enfermedades.

No obstante, estos aspectos de la producción están condicionados, al igual que sucede en el resto de las producciones animales, por otros factores que se pueden considerar como asociados al medio y que van a determinar tanto la calidad como la cantidad de producción piscícola.

1.2. Factores condicionantes en la Acuicultura

Las enfermedades de origen bacterianos son probablemente la causa más importante de pérdidas económicas en las piscifactorías. Además de los patógenos ya conocidos desde hace décadas como especies de los géneros *Vibrio*, *Photobacterium*, *Flexibacter* o *Aeromonas*, responsables de importantes enfermedades en Acuicultura, en estos últimos años se ha incrementado el número de brotes asociados a bacterias patógenas de peces emergentes. Este incremento está favorecido por los sistemas de cultivo intensivo utilizados en Acuicultura. En la Tabla 1 se incluyen los principales patógenos bacterianos causantes de mortalidad en peces cultivados en el medio marino.

Aunque se han descrito especies patógenas en la mayoría de los grupos bacterianos existentes, solamente un pequeño grupo de éstos causan enfermedades infecciosas provocando importantes pérdidas económicas en los cultivos intensivos de todo el mundo.

La vibriosis es la enfermedad bacteriana que más limita la producción industrial de peces cultivados en agua de mar en todo el mundo (Toranzo & Barja, 1990).

Listonella (Vibrio) anguillarum es el principal agente causal de la denominada vibriosis “típica” o “clásica”. Dicha bacteria es responsable de la aparición de importantes epizootias con graves pérdidas económicas en un elevado número de especies de peces como: rodaballo (*Scophthalmus maximus*), peces salmónidos (*Oncorhynchus spp* y *Salmo spp.*), lubina (*Dicentrarchus labrax*), bacalao (*Gadus moruna*), anguila (*Anguilla anguilla* y *A. japonica*) y ayu (*Plecoglossus altivelis*).

Vibrio vulnificus afecta principalmente a la anguila europea y fue aislado por primera vez en España en 1991. Aunque hasta ahora en España no existen problemas con *Vibrio salmonicida*, agente etiológico de la enfermedad de Hitra o vibriosis de aguas frías, este patógeno es, desde 1979, una de las causa más importantes de vibriosis en los países nórdicos (Toranzo & Barja, 1993).

Tabla 1.- Principales enfermedades bacterianas limitantes de la producción de cultivos marinos.

Agente	Enfermedad	Hospedador principal	Vacunas disponibles efectivas
<i>Listonella (Vibrio) anguillarum</i>	Vibriosis	Salmónidos Rodaballo Lubina Anguila Ayu Bacalao Besugo	+
<i>Vibrio vulnificus</i>	Vibriosis	Anguila	+
<i>Vibrio salmonicida</i>	Vibriosis	Salmónidos	+
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> (antes <i>Pasteurella piscicida</i>)	Pasteurelisis	Dorada Lubina Lenguado Seriola	+
<i>Tenacibaculum maritimum</i> (antes <i>Flexibacter maritimus</i>)	Flexibacteriosis	Rodaballo Lenguado Salmónidos Dorada Lubina	+
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	Forunculosis	Salmónidos Rodaballo	(+) ^a
<i>Renibacterium salmoninarum</i>	Enfermedad bacteriana del riñón (BKD)	Salmónidos	–
<i>Streptococcus iniae</i>	Estreptococosis	Seriola Lubina Platija	+ ^b
<i>Streptococcus parauberis</i>	Estreptococosis	Rodaballo	+
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	Pseudomonadiasis	Anguila Dorada Rodaballo Besugo	+ ^c

^aProtección limitada; ^bAlta protección pero duración dependiente del hospedador; ^cEn fase experimental

Introducción

Los síntomas clínicos comunes para todas las formas de vibriosis en peces son los típicos de una septicemia hemorrágica. Dependiendo del pez hospedador y de la especie de *Vibrio* predominarán unos síntomas u otros. En la actualidad la vibriosis clásica está prácticamente controlada por programas de prevención y vacunación (Toranzo et al., 1997).

La Pasteurelosis, es una enfermedad infecciosa causada por *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, conocida también como pseudotuberculosis o más recientemente fotobacteriosis. La susceptibilidad a la pasteurelosis depende del tipo de pez pero también de su tamaño. Se ha demostrado que en lubina y en dorada (*Sparus aurata*), los peces que superan los 100 g son resistentes a la infección causada por este patógeno, en cambio en las fases larvianas y de alevín puede ocasionar altas mortalidades, llegando hasta 80-100% de pérdidas en un corto periodo de tiempo. Actualmente, esta enfermedad está parcialmente controlada si se utilizan vacunas adecuadas (Romalde y Magariños, 1997). En los últimos años es uno de los principales factores limitantes del cultivo de lenguado (*Solea solea* y *S. senegalensis*) (Magariños et al., 2003).

La Flexibacteriosis marina es una enfermedad bacteriana causada por la especie *Tenacibaculum maritimum* (Suzuki et al., 2001) y que posee gran importancia en los cultivos marinos. Esta bacteria es el agente causal de un síndrome ulcerativo que produjo importantes mortalidades en Japón en peces marinos como el besugo del Pacífico (*Acanthopagrus schlegeli*). En España también han surgido casos de esta infección afectando principalmente a rodaballo, salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y lenguado (Devesa et al., 1989; Pazos et al., 1993; Santos et al., 1999; Avendaño-Herrera, 2004). Aunque hasta hace poco tiempo no existía ninguna vacuna comercial para prevenir esta enfermedad, nuestro laboratorio de la Universidad de Santiago ha desarrollado vacunas eficaces para su prevención (Toranzo et al., 1997; Romalde et al., 2005).

Otras enfermedades de gran importancia tanto para la piscicultura continental como marina, son la forunculosis y la enfermedad bacteriana del riñón (BKD). Aunque la forunculosis no fue detectada en Galicia hasta 1989, siendo aislada *Aeromonas salmonicida*

en salmón del Atlántico, en la actualidad es un factor limitante de la producción de salmónidos y rodaballo en España. Por el contrario, la enfermedad bacteriana del riñón (BKD) causada por *Renibacterium salmoninarum* ha sido un problema para el cultivo del salmón del Pacífico (*Oncorhynchus kisutch*) a finales de los años 80 (Toranzo & Barja, 1990), siendo su incidencia actual muy baja en España.

La Estreptococosis se considera una enfermedad bacteriana re-emergente que afecta a una gran variedad de peces en acuicultura marina y continental (Kitao, 1993; Bercovier et al., 1997; Romalde & Toranzo, 1999; 2002). *Streptococcus iniae* es el agente causal de la estreptococosis en tilapia (*Oreochromis* spp.) en USA e Israel y trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) en Israel. Así mismo, se ha aislado de peces marinos como seriola (*Seriola quinqueradiata*), platija (*Paralichthys olivaceus*) o lubina.

El agente causal de esta patología en rodaballo es *Streptococcus parauberis*, que puede afectar a peces de cualquier tamaño y edad. Para el control de la enfermedad en esta especie se ha desarrollado, en nuestro laboratorio, una bacterina que ha permitido controlar totalmente la enfermedad, consiguiendo una reducción notable de las pérdidas económicas que ocasionaba en los cultivos marinos (Romalde et al., 1999a).

La pseudomonadiosis producida por *Pseudomonas anguilliseptica* está considerada como una de las principales enfermedades emergentes para el cultivo de los peces marinos. Aunque esta bacteria ya se conocía de antiguo por causar septicemia hemorrágica en anguilas, no es hasta 1997 cuando se demuestra que *P. anguilliseptica* es el agente causal de la patología conocida como “Winter disease” en dorada. Muy recientemente se ha descrito en rodaballo, tanto en Francia como en España (Berthe et al., 1995; Romalde et al., 2003) y en besugo cultivado en España (López-Romalde et al., 2003)

2.- Representantes de la familia *Pseudomonadaceae* patógenas para peces.

Además de *Pseudomonas anguilliseptica*, existen dentro de la familia *Pseudomonadaceae*, otras especies patógenas para peces:

Pseudomonas chlororaphis. Esta bacteria fue la causante de una alta mortalidad en piscifactorías de trucha Amago (*Oncorhynchus rhodurus*) en Japón (Hatai et al., 1975). En estos momentos no es seguro si representa un problema emergente o es un invasor oportunista de peces ya enfermos.

Pseudomonas fluorescens. En los últimos 40 años, se ha descrito como un patógeno importante de peces (Shewan et al., 1960), un invasor secundario de tejidos de peces ya dañados (Otte, 1963), o como un patógeno primario débil (Roberts y Horne, 1978; Csaba et al., 1981; Ahne et al., 1982).

Pseudomonas pseudoalcaligenes. Durante 1992 fue aislada de un grupo de truchas arcoiris de una piscifactoría de Reino Unido que presentaban severas lesiones en la piel e infecciones por *Yersinia ruckeri* (Austin & Stobie, 1992).

Pseudomonas putida. Sólo ha habido una mención de *P. putida* como posible patógeno de peces en Japón (Muroga, 1990), asociada a mortalidades de ayu cultivado.

En la Tabla 2 se reflejan las características principales de estas especies.

Tabla 2.- Características comunes y diferenciales de las distintas especies de la familia *Pseudomonadaceae* patógenas para peces^a.

Prueba	Especie			
	<i>P. anguilliseptica</i>	<i>P. chlororaphis</i>	<i>P. pseudoalcaligenes</i>	<i>P. fluorescens</i>
Gram	-	-	-	-
Movilidad	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+
β-galactosidasa	-	-	-	-
ADH	-	+	V ^b	+
O/F	O	O	O	O
Producción de:				
Indol	-	-	-	-
H₂S	-	-	-	-
pigmentos	-	+	-	+
Citrato	+	+	V	+

^a Datos obtenidos de Palleroni (1984).

^bV, reacción variable

3 . Pseudomonadiosis por *Pseudomonas anguilliseptica*

3.1. Características de P. anguilliseptica

Aunque las descripciones realizadas hasta el momento no son muy extensas en cuanto a las características fenotípicas del patógeno (Austin & Austin, 1999), esta bacteria se ha descrito como un bacilo, Gram-negativo, móvil, citocromo oxidasa positivo y negativo para la producción de H₂S e indol. Además, es oxidativo en la prueba de oxidación-fermentación de la glucosa, gelatinasa positivo y puede crecer en medios conteniendo del 0 a 4% de NaCl y a temperaturas de 5° a 30°C, pero no a 37°C.

3.2. Variabilidad dentro de la especie P. anguilliseptica

a) Estudios serológicos

En estudios serológicos realizados por Nakai et al. (1981, 1982) se había indicado la existencia de dos grupos antigénicos en *P. anguilliseptica* de acuerdo con la presencia de antígeno K (termolábil), mientras que el antígeno O termoestable lo consideraban homogéneo en todas las cepas estudiadas. Trabajos posteriores (Nakai et al., 1985a) describieron un tercer serotipo en función del antígeno K. Según estos trabajos, los tres serotipos se correspondían con cepas de *P. anguilliseptica* aisladas de anguila con cápsula (serotipo K+-1), cepas aisladas de anguila sin cápsula (serotipo K-) y cepas aisladas de ayu con cápsula (serotipo K+-2). Además, según estos mismos autores, *P. anguilliseptica* podía ser rápidamente identificada y distinguirla de otras bacterias patógenas de peces por técnicas serológicas.

Estudios posteriores realizados con aislados procedentes de peces salmónidos indicaron la presencia de un antígeno K distinto al presente en los aislados de anguila (Wiklund & Bylund., 1990). Este hecho indica que la composición del antígeno K es dependiente del tipo de hospedador de *P. anguilliseptica*.

b) Estudios moleculares

Como especie, *P. anguilliseptica* forma un grupo homogéneo dentro del género *Pseudomonas*. Sin embargo, es necesario un estudio más detallado de los aislados para comprobar la existencia de variabilidad intraespecífica.

- Plásmidos

Los plásmidos son moléculas de DNA extracromosómico bicatenario circular dotados de replicación autónoma. Estos pueden tener distintos tamaños dependiendo de los pares de bases que los compongan y pueden aparecer en número variable en el interior de las células bacterianas. En general los plásmidos más pequeños tienen un número elevado de copias y los plásmidos de gran tamaño se encuentran en número muy reducido.

Un gran número de características fenotípicas se relacionan con la presencia de plásmidos como la producción de toxinas, metabolismo de carbohidratos simples, producción de bacteriocinas, síntesis de enzimas intra- o extracelulares o la resistencia a determinados antimicrobianos.

El estudio de la dotación plasmídica fue el primer método genotípico de tipificación epidemiológica. Posee un alto poder de discriminación principalmente cuando se usa en combinación con otros métodos de tipificación y una misma metodología puede ser aplicada a distintos géneros y especies bacterianas. La aplicación adicional de enzimas de restricción al estudio del DNA plasmídico es útil sobre todo en aquellas cepas con un único plásmido o cuando existan perfiles plasmídicos similares.

- Métodos basados en la PCR

Con el objetivo de profundizar en la identificación de los distintos genotipos existentes dentro de cada especie, se han evaluado en este trabajo una serie de técnicas de

Introducción

tipado molecular que permitan determinar las diferencias intraespecíficas existentes en *P. anguilliseptica* de una manera rápida, sensible y reproducible.

Debido a que las técnicas empleadas hasta el momento para la determinación de la variabilidad genética resultaban demasiado laboriosas o caras para utilizarlas de rutina en el laboratorio, ha sido necesario el desarrollo de métodos de tipado molecular basados en la PCR, como: RAPD, ERIC o REP-PCR.

La técnica de RAPD se basa en la utilización de cebadores de secuencia arbitraria que se alinean de manera aleatoria con secuencias presentes a lo largo del genoma bacteriano. Una vez estandarizado el sistema RAPD-PCR permite la obtención de patrones de amplificación característicos y reproducibles (Romalde et al., 1999b).

Los métodos de tipado ERIC y REP-PCR se basan en la amplificación por la técnica de PCR de elementos de DNA repetitivos altamente conservados (Hulton et al., 1991; Stern et al., 1984), presentes en los genomas bacterianos de la mayoría de las bacterias Gram-negativas y alguna Gram-positivas. Estas secuencias suelen ser estables y sólo difieren en el número de copias y en su localización en el genóforo, resultando una buena vía para la diferenciación de los distintos aislados. Además estos elementos forman estructuras secundarias, que tienen un papel importante en la organización del genoma bacteriano (Louws et al., 1994) y, su disposición puede ser indicadora de la estructura y evolución del genoma bacteriano.

3.3. Distribución geográfica y rango de hospedadores

Como se ha mencionado anteriormente *P. anguilliseptica* es un patógeno emergente que ha ganado importancia clínica por ser responsable de la aparición de numerosos brotes infecciosos, causando un incremento de la mortalidad de distintas especies de peces.

En 1971, se aisló por primera vez en anguila japonesa afectada por septicemia hemorrágica en Japón (Wakabasayhi & Egusa, 1972; Kuo & Kou, 1978). Desde entonces está considerada como una de las enfermedades más devastadoras en el cultivo de la anguila en ese país asiático (Nakai & Muroga, 1979)

En 1981, su distribución geográfica se extendió a los mares de Escocia (Ellis et al., 1983). Años más tarde, en Finlandia provocó brotes de la enfermedad en piscifactorías de salmónidos entre 1986 y 1991 (Wiklund & Dalsgaard, 1987; Wiklund & Bylund, 1990; Lönnström et al., 1994). En 1989, se produjo un brote de septicemia hemorrágica asociada a esta enfermedad en una población de anguila europea en Francia (Berthe et al., 1995) y, desde 1990, se ha detectado también en granjas de dorada, lubina y rodaballo en este país. También se han descrito brotes de la enfermedad en anguila cultivada en Holanda a finales de la década de los 90 (Haenen et al., 1997).

La dorada es una de las especies de peces marinos más cultivada en el Mediterráneo. En los últimos años, se han ido recopilando datos sobre un aumento de mortalidad causada por *P. anguilliseptica* durante los meses de invierno en este área geográfica lo que se tradujo en grandes pérdidas económicas en el sector (Barnabe, 1990; Doménech et al., 1997). En el año 2000, se han detectado asimismo brotes de la enfermedad causada por este patógeno en piscifactorías de rodaballos en España (Romalde et al., 2001).

Las especies de cultivo más importantes en la Acuicultura española son la dorada, el rodaballo y la lubina debido tanto a su productividad como a su alto valor económico. Debido a su éxito comercial, el esfuerzo se centra ahora en la búsqueda de nuevas especies de cultivo alternativas a las ya existentes, teniendo esto como finalidad el aumento de la diversidad dentro del mercado.

El besugo (*Pagellus bogaraveo*) es una especie de gran interés en la maricultura, porque tiene un alto valor económico debido a su escasez en el mercado, así como por sus características biológicas (Linares et al., 1999; Peleteiro et al., 1999). Algunas piscifactorías en España están introduciendo el besugo en sus cultivos, tanto en tanques de hormigón, como en jaulas flotantes, con prometedores resultados (Linares et al., 1999). Hasta el momento, hay pocos datos disponibles sobre enfermedades que afecten a esta especie de pez, aunque recientemente en España se han detectado brotes de linfocistis y pseudomonadiosis (Alonso et al., 2005; López-Romalde et al., 2003).

P. anguilliseptica es un patógeno emergente que afecta a un gran número de especies marinas de cultivo. Aunque inicialmente fue descrita en anguila japonesa, con el

Introducción

aumento de especies cultivadas, aumentó también el número de especies a partir de las cuales se aisló: anguila europea, besugo del Pacífico, ayu, salmón atlántico, trucha (*Salmo trutta*), trucha arcoiris, bacalao, arenque, jurel dentón (*Pseudocaranx dentex*), mero (*Epinephelus cernoides*), dorada, lubina y rodaballo. En este trabajo se recoge el primer caso de pseudomonadiosis en besugo cultivado en España.

3.4. Síntomas clínicos

Los síntomas clínicos de la enfermedad parecen ser los mismos en todas las especies estudiadas, aunque parece que tanto la anguila europea como las demás especies afectadas suelen presentar una patología menos severa que la anguila japonesa (Austin & Austin, 1999). Dependiendo del grado de infección pueden presentar una apariencia normal, o por el contrario presentan hemorragias en la piel, boca, opérculo branquial, zona ventral del cuerpo del animal y distensión abdominal (Doménech et al., 1997; Austin & Austin, 1999).

Internamente, el signo clínico más frecuente y distintivo es la presencia de fluido ascítico en la cavidad peritoneal. El hígado se muestra pálido y en algunos casos se observan hemorragias. El riñón suele verse afectado y en el intestino puede encontrarse un exudado amarillento (Doménech et al., 1997; Austin & Austin, 1999).

3.5. Epizootiología

Aunque la enfermedad provocada por *P. anguilliseptica* afecta a una gran variedad de peces de importancia económica como la dorada, anguila, lubina y rodaballo, hasta el momento se han realizado pocos estudios con el fin de esclarecer sus reservorios y los mecanismos de transmisión de la enfermedad (Austin & Austin, 1999).

En los últimos años han aumentado el número de enfermedades bacterianas que afectan a peces cultivados en piscifactorías. Es sabido que a esto contribuyen los intensos sistemas utilizados en Acuicultura que provocan alteraciones de los factores físico-químicos y biológicos, aumentando la susceptibilidad de los peces a infecciones originadas por microorganismos patógenos.

Sin embargo, al igual que sucede con otras especies bacterianas, son pocos los estudios en los que se describe la influencia de los parámetros ambientales sobre la supervivencia de *P. anguilliseptica* en el medio acuático.

Se cree que existe una relación entre el desarrollo de la epizootia y la temperatura del agua, puesto que la mayor parte de las septicemias ocurridas en las diferentes áreas geográficas, se han producido en los meses de invierno, cuando la temperatura del agua era inferior a 11-12°C (Austin & Austin, 1999).

Hasta el momento se desconoce el modo de transmisión de este patógeno en el medio acuático.

4. Factores de virulencia

Bajo el término de factores de virulencia se incluyen un conjunto de propiedades que confieren a los microorganismos la capacidad de sobrevivir en un hospedador, generando como consecuencia el desarrollo de una enfermedad e incluso la muerte.

Los microorganismos deben poseer factores de virulencia que le permitan invadir superficies del hospedador, penetrar en los tejidos para multiplicarse en los mismos y finalmente diseminarse por todo el organismo huésped. La ausencia de los mecanismos precisos para conseguir superar cualquiera de los pasos anteriores se traducirá en la pérdida de la virulencia (Finaly & Falkow, 1989).

En el establecimiento de una bacteria patógena en un hospedador susceptible están implicados los siguientes factores:

- En primer lugar, el microorganismo debe de ser capaz de adherirse y/o penetrar a través de las superficies corporales del hospedador que están expuestas al medio externo, entre estas cabe destacar la superficie mucosa de las branquias, la piel y la parte posterior del tracto intestinal.

Introducción

Tabla 3.- Comparación de las características de *P. anguilliseptica* en las descripciones publicadas por diferentes investigadores.

PRUEBA	Michel et al. (1992)	Berthe et al. (1995)	Lönnström et al. (1994)	Doménech et al. (1997)	Wiklund y Bylund (1990)
Gram	-	-	-	-	-
Morfología ^a	BL	B	B	F	B
Movilidad	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+
O/F	O	O	O	O	O
Hemólisis	-	-	-	-	-
ADH	-	ND ^b	-	V ^c	-
LDH	-	-	-	-	-
ODC	-	-	-	-	-
ONPG	-	ND	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-
V.P	ND	ND	ND	ND	-
Nitrato	-	-	-	-	-
Citrato	ND	+	V	+	V
Urea	-	-	-	-	-
Gelatinasa	+	-	V	V	V
Caseína	ND	+	V	ND	ND
Esculina	ND	-	-	-	-
Tween 20	ND	+	ND	ND	ND
Tween 80	+	+	V	ND	V
Almidón	ND	-	-	ND	-
DNasa	V	+	-	-	-
T ^a de crec:					
4°C	+	+	+	+	+
10-30°C	+	+	+	+	+
37°C	-	-	-	-	-
Salinidad:					
0%	+	+	+	+	+
1-2%	+	+	+	+	+
3%	+	+	+	+	+
>4%	-	-	-	-	-

^aBL, bacilar larga; B, bacilar; F, filamentosa.

^bND, dato no incluido en la descripción.

^cV, variable.

- Después de la ruptura de esta barrera de defensa primaria, los componentes internos del sistema inmune del hospedador deben ser neutralizados de forma que la supervivencia y capacidad de proliferación del patógeno estén aseguradas.
- Finalmente el agente patógeno debe ser capaz de penetrar hasta un tejido específico y allí multiplicarse, alcanzando el número crítico de células que le permitan invadir el organismo y desarrollar la infección.

La inmensa diversidad de patógenos bacterianos existentes ha desarrollado una multitud de estrategias para superar los mecanismos de defensa del hospedador y dar lugar al proceso infeccioso.

De este modo, las propiedades asociadas a la superficie celular bacteriana junto con los productos extracelulares (ECP) secretados por las bacterias se consideran importantes factores de virulencia implicados en los procesos de colonización y penetración.

4.1. Grado de virulencia

El primer paso en todo estudio de patogenicidad microbiana, es el establecimiento de métodos para la cuantificación y comparación de la virulencia de diferentes cepas de la especie a estudiar (Smith, 1984). El grado de virulencia de cada cepa puede estar influenciada por un alto número de variables como son la ruta de inoculación, el medio de cultivo utilizado, la fase de crecimiento del inóculo, así como la especie de animal de experimentación utilizado y su estado fisiológico (Davis et al., 1981).

La virulencia de un organismo (o una toxina) se expresa normalmente en términos de Dosis Letal ₅₀ (DL₅₀) que se define como la dosis necesaria para matar al 50% de los animales inoculados en un tiempo dado (Davis et al., 1981).

4.2. Factores de virulencia en P. anguilliseptica

Aunque se ha demostrado que *P. anguilliseptica* es patógena para un gran número de especies de peces, hasta el momento se han realizado pocos trabajos enfocados al estudio de los factores de virulencia de este microorganismo.

Los plásmidos pueden jugar un papel importante, por codificar para determinantes de virulencia que pueden ser responsables de la presencia de antígenos de superficie específicos que permiten el ataque de la bacteria a las células del pez o, alternativamente, pueden operar vía producción de exotoxinas implicadas en los procesos de invasión (Magariños, 1991). No se ha estudiado el contenido plasmídico en aislados de *P. anguilliseptica*, ni tampoco se ha comprobado la existencia de exotoxinas. Sin embargo, se conoce la capacidad de este patógeno de degradar determinadas proteínas (gelatina) y lípidos (Tween 80), por lo que se ha especulado con la posible participación de exoenzimas en el mecanismo de patogenicidad (Austin & Austin, 1999).

Otro factor que puede tener importancia en la virulencia de bacterias patógenas de peces es la producción de material capsular (Magariños et al., 1996). De hecho, en los años 80 se comprobó, mediante inoculaciones experimentales de varias especies de peces (que incluían anguila, carpa, tilapia, trucha arco-iris, entre otras), que los aislados de *P. anguilliseptica* que presentaban cápsula mostraban una mayor patogenicidad que los que carecían de ella, mostrando los primeros dosis letales inferiores en al menos tres unidades logarítmicas (Nakai, 1985; Nakai et al., 1985 b,c).

5. Sistemas de detección.

Hasta el momento, las técnicas empleadas para la detección de la pseudomonadiosis en peces se basaban en el análisis bacteriológico clásico, que consiste en la siembra a partir de órganos para el posterior aislamiento del patógeno y la identificación mediante pruebas bioquímicas. Las principales desventajas del método son:

- El lento crecimiento del microorganismo, siendo necesario el uso de medios enriquecidos (como agar sangre)
- Poca reacción de este patógeno en la mayoría de las pruebas bioquímicas utilizadas en la identificación bacteriana.

Aunque en este trabajo también se incluyen estudios que prueban la validez de los sistemas comerciales miniaturizados API (API 20NE y API ZYM) para la identificación de *P. anguilliseptica*, que constituyen un avance en la identificación del patógeno, siguen teniendo el inconveniente de necesitar para su utilización el reaislamiento del organismo en cultivo puro, lo que a veces es difícil por el sobrecrecimiento de otras bacterias que puedan estar presentes en la muestra. Este hecho, además, se ve agravado en el caso de peces portadores.

Por tanto, es necesario el desarrollo de técnicas moleculares específicas, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con las que se pueda realizar un diagnóstico rápido en animales enfermos, y evitar el desarrollo de la enfermedad mediante la detección del patógeno en animales portadores.

La técnica de PCR permite amplificar de manera selectiva fragmentos del DNA de un determinado microorganismo, situados entre dos regiones cuyas secuencias son conocidas. El proceso de detección de un agente infeccioso por PCR se desarrolla generalmente en tres etapas. La primera consistiría en la extracción del DNA del microorganismo de interés, seguido de la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa. Finalmente, la tercera etapa es la que se produce la detección de los amplicones, mediante electroforesis en geles de agarosa, en la que los fragmentos de DNA se separan según su tamaño, y cuya visualización se realiza mediante tinción con bromuro de etidio y posterior exposición a la luz ultravioleta. Por su rapidez, especificidad y sensibilidad, la PCR se ha convertido en una técnica de gran aplicación en la identificación de microorganismos, resultando muy útil en aquellos casos en los que los métodos convencionales no son concluyentes o cuando el aislamiento del microorganismo es muy complejo. Así mismo, puede ser un método de elección cuando se requiera un diagnóstico

Introducción

rápido y precoz del agente etiológico para poder iniciar el tratamiento específico lo antes posible.

Aunque en la mayoría de los casos la determinación cualitativa del producto de PCR puede ser suficiente para el diagnóstico de un proceso infeccioso, en otras situaciones la cuantificación del número de microorganismos iniciales presentes en la muestra puede resultar necesaria para la confirmación de la enfermedad. La cuantificación del DNA inicial mediante PCR convencional resulta complicada, debido a que la eficacia de amplificación va disminuyendo con el tiempo, hasta que llega a una fase de saturación en la que ya no se produce incremento de DNA. Puesto que los fragmentos amplificados se detectan al final de la PCR cuando la mayoría de las reacciones han alcanzado ya la fase de saturación, la cantidad de DNA obtenido no suele guardar mucha relación con la concentración inicial de DNA en las muestras. Además, al ser la PCR una reacción de tipo exponencial, pequeñas oscilaciones en la eficacia de amplificación para cada muestra se traducen en importantes variaciones en la cantidad de DNA obtenido al final del proceso. Para superar estas limitaciones del método se han desarrollado diversas estrategias. La más común consiste en hacer que el DNA diana compita durante la amplificación con una cantidad conocida de control interno añadida antes de iniciar el proceso (PCR competitiva). Sin embargo, estos métodos son laboriosos, poco precisos y suelen tener un rango de cuantificación limitado. En estas situaciones, los sistemas de PCR cuantitativa (“Real-Time PCR”) pueden resultar una alternativa para la determinación de la cantidad de microorganismos en las muestras de estudio.

La PCR en tiempo real (rt-PCR) ofrece una herramienta ideal para el desarrollo de una gran variedad de pruebas moleculares para la identificación y cuantificación de los agentes infecciosos de interés, por aportar indudables ventajas frente a la PCR convencional como la facilidad de empleo, la mayor rapidez y sensibilidad o el menor riesgo de contaminación.

En la rt-PCR, los procesos de amplificación y detección se realizan de manera simultánea, eliminándose, de esta forma, el tercer paso de la PCR convencional, reduciendo el tiempo necesario para la detección del patógeno.

Para la realización de este tipo de amplificación del DNA se utilizan termocicladores que llevan incorporado un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida por cada una de las reacciones en las que se produce amplificación. Además, mediante la utilización de fluorescencia para la detección se puede conocer durante el proceso de amplificación la cantidad de DNA sintetizado en cada momento, debido a que la cantidad de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de DNA formado. Esto permite cuantificar el DNA presente en cada una de las reacciones. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR a tiempo real pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas.

Los agentes intercalantes son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a DNA de doble cadena. Al intercalarse entre las bases, refuerza el efecto de apilamiento que contribuye a la estabilidad de la doble hélice. El más empleado en PCR en tiempo real es el SYBR[®] Green. El incremento de la cantidad de DNA en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida.

La obtención de resultados óptimos en cualquier PCR cuantitativa requiere que la reacción sea específica y eficiente, ya que una buena eficiencia asegura la reproducibilidad de las reacciones, lo que a su vez garantiza la precisión de los resultados. El trabajar con agentes intercalantes, SYBR[®] Green, tiene el inconveniente de su baja especificidad, ya que se unen indistintamente a cualquier producto de amplificación, independientemente de que sea éste específico de la reacción, o dímeros producidos por los propios cebadores. Para poder discernir entre los distintos productos de amplificación y los dímeros de cebadores, los termocicladores utilizados en la PCR cuantitativa ofrecen la posibilidad de determinar la temperatura de fusión de los fragmentos amplificados (T_m = temperatura a la que el 50% del DNA de la molécula está desnaturalizado), poseyendo cada amplicón una T_m característica, dependiente sobre todo de su longitud y de su contenido G/C. Esta aplicación permite comprobar la especificidad de los fragmentos detectados en la PCR. Para mejorar la especificidad se deben emplear condiciones de reacciones óptimas y una buena selección de cebadores para disminuir la posibilidad de formación de dímeros.

Introducción

Las sondas de hibridación específicas están marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre dos moléculas. Las más utilizadas son las sondas Taqman, las “molecular beacon” y las sondas FRET. En todos estos sistemas, el incremento de DNA en cada ciclo se corresponde con un aumento de hibridación de las sondas, lo que conlleva un aumento en la misma proporción de fluorescencia emitida. El empleo de sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales, pero su coste es mucho más elevado que el SYBR[®] Green y la optimización de las condiciones de la reacción resulta más difícil.

Las aplicaciones de la rt-PCR no difieren de las que ya se han comentado para la PCR convencional. No obstante, al ofrecer numerosas ventajas como la sencillez de su empleo, la rt-PCR irá progresivamente reemplazando a la PCR clásica, y su aplicación se extenderá a un mayor número de agentes infecciosos, implantándose en un futuro como un proceso de rutina.

6. Tratamiento y vacunación

Son escasos los trabajos sobre el control de la pseudomonadiosis con quimioterápicos. Los compuestos utilizados normalmente en Acuicultura, como ampicilina, oxitetraciclina, sulfonamidas, trimetoprim, ácido oxolínico o flumequina, suelen ser muy efectivos “in vitro” (Michel et al., 1992; Wiklund & Bylund, 1990); sin embargo, se cuestiona su efectividad “in vivo”. Así, Wiklund & Bylund (1990) intentaron tratar salmón Atlántico afectado de pseudomonadiosis con oxitetraciclina (75 mg/kg) durante 8 días, pero esto sólo permitió reducir parcialmente las mortalidades. Por su parte, Doménech et al. (1997) observaron que tanto el ácido oxolínico como la oxitetraciclina, administrados por vía oral, eran efectivos únicamente cuando la temperatura del agua era superior a 17-18°C, pero no a temperaturas inferiores.

Debido a los efectos colaterales no deseables derivados del uso de antibióticos, algunos autores han propuesto técnicas alternativas. Así la enfermedad puede ser eliminada

con efectividad aumentando la temperatura del agua a 26-27°C (Muroga et al., 1975; Stewart et al., 1983). Se ha postulado que el método funciona al impedir las altas temperaturas el crecimiento de la bacteria. Además, se ha demostrado que el suero normal de anguila es capaz de lisar más rápidamente las células bacterianas a 28°C que a 20°C (Nakai et al., 1985a; Wiklund & Bylund, 1990). Sin embargo, aunque el método de control es factible en anguila o dorada, no se puede utilizar para rodaballo y otras especies de peces que no toleran esa temperatura.

Respecto a las medidas de prevención de la septicemia producida por *P. anguilliseptica*, existen pocos trabajos orientados en este aspecto. Nakai & Muroga (1979) ensayaron la eficacia de preparaciones antigénicas (células formolizadas) siendo la ruta de administración la inyección intramuscular. La inmunidad persistía cinco meses a una temperatura de 20°C.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

Los objetivos que nos propusimos alcanzar en la realización de este trabajo fueron los siguientes:

1.- Caracterización bioquímica de los aislados de *P. anguilliseptica* causantes de importantes mortalidades en dorada, rodaballo y besugo en España, comparándolas con cepas de distinto origen geográfico y de hospedador.

2.- Estudio serológico de los aislados de *P. anguilliseptica* para determinar la existencia de posibles serotipos diferentes dentro de la especie.

3.- Estudio de la variabilidad intaespecífica existente en *P. anguilliseptica* mediante caracterización molecular de los aislados.

4.- Desarrollo y optimización de un protocolo de PCR que sea rápido y específico para el diagnóstico de la pseudomonadiosis, enfermedad causada por el patógeno *P. anguilliseptica*. Evaluación de la eficacia del método y su aplicabilidad para la detección directa del patógeno en los tejidos de pez.

5.- Determinación de los factores de virulencia celulares y extracelulares de las cepas incluidas en este estudio.

6.- Diseño de una vacuna frente a la pseudomonadiosis de peces y evaluación de su eficacia en rodaballo y dorada.

**III. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA, SEROLÓGICA
Y MOLECULAR DE *P. anguilliseptica***

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Cepas bacterianas: origen y conservación

Las cepas bacterianas empleadas en este estudio y consideradas presuntamente como *P. anguilliseptica*, se aislaron a partir de doradas procedentes de diversas piscifactorías del litoral mediterráneo y de rodaballo de piscifactorías de Galicia. Además, durante el invierno de 2003 se detectó un episodio de bajas mortalidades (0,1-0,2%) en una población de cultivo experimental de besugo, que supuso el primer caso de pseudomonadiosis en esta especie de pez. Los aislados resultantes se incluyeron así mismo en este trabajo. Con fines comparativos se han incluido otras cepas de diferentes orígenes y países (Tabla 4).

En el presente trabajo se incluyeron también una relación de cepas de referencia tanto de otras especies del género *Pseudomonas* como de otros grupos bacterianos relacionados, tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. stutzeri*, *P. doudorofii*, *Pseudomonas sp.*, *Brevundimonas diminuta* (antes *P. diminuta*), *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (antes *Pseudomonas nautica*), *Marinomonas vaga* (antes *Alteromonas vaga*), *Halomonas aquamarina* (antes *Alteromonas aquamarina*), *Deleya venusta*, y *Aeromonas media*.

El aislamiento bacteriano a partir de peces enfermos se realizó por siembra directa en agar Trypticase soja (Difco) suplementado con un 1% de NaCl (TSA-1) o placas de Agar sangre (AS, Oxoid) a partir del hígado, riñón y cerebro. Después del periodo de incubación (48 h) a 22-24°C, se realizaron resiembras sucesivas en placas de agar sangre hasta la obtención de cultivos puros.

Los aislados bacterianos así obtenidos, fueron sometidos a una caracterización bioquímica preliminar que incluía las pruebas: morfología y movilidad, carácter Gram, presencia del citocromo oxidasa y prueba de oxidación/fermentación (O/F). Los bacilos móviles, Gram negativos, citocromo oxidasa positivos y oxidativos en la prueba O/F fueron seleccionados para su posterior caracterización.

Las cepas seleccionadas se cultivaron de forma rutinaria en placas de TSA-1, agar sangre y en caldo Trypticase soja suplementado con 1% de NaCl (TSC-1). La incubación se realizó a 22-24°C durante 48 h.

Para la conservación de las cepas se utilizaron dos métodos diferentes, viales de agar blando con aceite mineral y congelación.

a) Conservación con aceite mineral

Las cepas seleccionadas se inocularon por picadura en medio Agar Motility (casitona 1% p/v; agar 0,4% p/v; extracto de levadura 0,3% p/v) y se incubaron a una temperatura de 22-24°C durante 48 h. A continuación se le añadió una capa de aceite de parafina líquido estéril y se mantuvieron a 15°C.

b) Conservación por congelación.

Se realizó la congelación en viales de TSC-1 suplementado con un 15% de glicerol estéril. En ambos casos, los viales se someten a una congelación lenta mediante pases sucesivos a 4°C, -30°C y -70°C. Para la descongelación los viales se introducen en un baño de agua a 37°C, con agitación vigorosa. Para asegurar la recuperación, las cepas se siembran paralelamente en medio sólido y líquido.

2. Caracterización bioquímica y fisiológica de los aislados.

Para la caracterización de los aislados se emplearon simultáneamente métodos convencionales en tubo y placa (Wiklund & Bylund, 1990; Romalde, 1992; MacFaddin, 1993; Thoesen, 1994; Berthe et al., 1995), así como los sistemas miniaturizados API 20NE y API ZYM. La temperatura de incubación en todos los casos fue de 22-24°C

2.1. Métodos convencionales en tubo y placa

Las pruebas morfológicas, bioquímicas y fisiológicas utilizadas para la identificación mediante los métodos convencionales se citan a continuación, siendo el tiempo de incubación para todas estas pruebas de 48 h, excepto para las pruebas de utilización de azúcares, en las que el período se amplió hasta 7 días.

Tabla 4.- Cepas de *Pseudomonas anguilliseptica* incluidas en este estudio

Cepa	Hospedador	País	Año	Referencia ^a
75/98.1	Dorada	España	1998	Colección del laboratorio
99/50	Dorada	España	1999	Colección del laboratorio
TW-P1	Dorada	España	2000	Colección del laboratorio
TW-P2	Dorada	España	2000	Colección del laboratorio
TW-P3	Dorada	España	2000	Colección del laboratorio
TW 7	Dorada	España	2001	Colección del laboratorio
TW 444	Dorada	España	2001	Colección del laboratorio
TW 47-L-1	Dorada	España	2002	Colección del laboratorio
9/02 J.1	Dorada	España	2002	Colección del laboratorio
9/02 J.3	Dorada	España	2002	Colección del laboratorio
C224	Dorada	España	2002	Colección del laboratorio
C225	Dorada	España	2002	Colección del laboratorio
C9043	Dorada	España	2002	Colección del laboratorio
35-L3	Dorada	España	2002	Colección del laboratorio
35-L4	Dorada	España	2002	Colección del laboratorio
LD 4.3	Rodaballo	España	2000	Colección del laboratorio
RQ 171.1	Rodaballo	España	2001	Colección del laboratorio
RQ 174.1	Rodaballo	España	2001	Colección del laboratorio
RQ 174.2	Rodaballo	España	2001	Colección del laboratorio
RQ 175.1	Rodaballo	España	2001	Colección del laboratorio
RQ 175.2	Rodaballo	España	2001	Colección del laboratorio
AZ 196.1	Rodaballo	España	2001	Colección del laboratorio
AZ 197.1	Rodaballo	España	2001	Colección del laboratorio
RPM 733.1	Rodaballo	España	2001	Colección del laboratorio
AZ 208.1	Rodaballo	España	2002	Colección del laboratorio
AZ 208.2	Rodaballo	España	2002	Colección del laboratorio
AZ 209.1	Rodaballo	España	2002	Colección del laboratorio

Tabla 4.- Cont.

Cepa	Hospedador	País	Año	Referencia^a
AZ 209.2	Rodaballo	España	2002	Colección del laboratorio
AZ 210.1	Rodaballo	España	2002	Colección del laboratorio
AZ 210.2	Rodaballo	España	2002	Colección del laboratorio
AZ 211.1	Rodaballo	España	2002	Colección del laboratorio
AZ 211.2	Rodaballo	España	2002	Colección del laboratorio
TW 10/03	Besugo	España	2003	Colección del laboratorio
CI 3.1	Besugo	España	2003	Colección del laboratorio
LPAA 11705	Rodaballo	Francia	1994	J.F. Bernardet
JIP 14/91	Dorada	Francia	1991	J.F. Bernardet
JIP 24/91	Dorada	Francia	1991	J.F. Bernardet
JIP 02/92	Dorada	Francia	1992	J.F. Bernardet
JIP 02/92(2)	Dorada	Francia	1992	J.F. Bernardet
LPAA 11066	Lubina	Francia	1991	J.F. Bernardet
W 12-91	Arenque	Finlandia	1991	J.F. Bernardet
P40B/91	Trucha arcoiris	Finlandia	1991	T. Wiklund
P14B/94	Trucha arcoiris	Finlandia	1994	T. Wiklund
P32/00	Trucha común	Finlandia	2000	T. Wiklund
P19/00	Salmón	Finlandia	2000	T. Wiklund
CECT 899 ^T	Anguila japonesa	Japón	1971	CECT
CECT 901 ^b	Anguila europea	UK	1981	CECT
JIP 36/90(3)	Anguila europea	Francia	1990	J.F. Bernardet
910315-1/	Anguila europea	Dinamarca	1991	I. Dalsgaard
910315-1/6	Anguila europea	Dinamarca	1991	I. Dalsgaard
970129-2/2	Anguila europea	Dinamarca	1997	I. Dalsgaard
970129-2/3	Anguila europea	Dinamarca	1997	I. Dalsgaard

^a Direcciones: J.F. Bernardet, Unité de Virologie et Immunologie Moléculaires, Centre de Recherches INRA, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France; I. Dalsgaard, Danish Institute for Fisheries Research, Fish Disease Laboratory, Stigbøjlen 4, 1870 Frederiksberg C, Denmark; T. Wiklund, Department of Biology, Abo Akademi University, 29520 Abo, Finland; CECT, Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, España.

^b CECT 901 = NCIMB 2186.

-Morfología y movilidad:

La morfología y movilidad celulares se determinaron por observación directa al microscopio de contraste de fases (400X) de una suspensión en PBS (Tampón fosfato salino pH 7,2) de una colonia de un cultivo fresco en placa.

- Carácter Gram:

Se empleó el método de Buck (1982) con KOH. Sobre un portaobjetos con unas gotas de KOH (3%) se dispersó, con un palillo estéril, una colonia de cultivo fresco en placa de cada aislado. Las bacterias Gram-negativas producen un aumento de la viscosidad de la solución, mientras que las bacterias Gram-positivas no producen ningún cambio.

- Oxidasa:

Se realizó siguiendo el método de Kovacs (1956). En un papel de filtro Whatman nº1 impregnado en una solución acuosa al 1% de tetrametil-parafenil-diamina, se deposita una fracción de cultivo fresco. Esta técnica se basa en la detección de la enzima citocromo-oxidasa, las bacterias que la presentan producen un color violeta al entrar en contacto con el reactivo (10 s), al activarse la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular.

- Catalasa:

La producción de catalasa se determina adicionando unas gotas de peróxido de hidrógeno al 3% sobre un cultivo en placa del microorganismo. Las bacterias son consideradas positivas para este carácter si se aprecia la formación de burbujas.

- Carácter Oxidativo-Fermentativo (O/F):

Este método se realizó utilizando el medio basal O/F de Hugh & Leifson (1953), pH 6,8 (Difco) suplementado con un 1% de glucosa. Se determinó inoculando cada una de las cepas en dos tubos con este medio y manteniendo uno de ellos en condiciones aeróbicas y al otro en anaerobiosis. Si al finalizar la incubación se produce un cambio de color del medio (de verde a amarillo), tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, se

considera que el microorganismo posee un metabolismo fermentativo. Si el cambio de color es sólo en aerobiosis posee un metabolismo oxidativo.

- Descarboxilación de aminoácidos:

Esta prueba mide la capacidad de un organismo para realizar la descarboxilación enzimática de un aminoácido produciendo aminas, con la consiguiente alcalinización del medio. El medio basal utilizado fue el de Moeller (1955), suplementado con los siguientes aminoácidos: L-arginina, L-lisina, L-ornitina en una concentración final del 1%. En el caso de la arginina se realizó además la prueba de Thornley que utiliza como marcador el rojo fenol. La reacción, en todos los casos, tiene lugar en anaerobiosis, por lo que es necesario añadir una pequeña capa de aceite de parafina en los tubos inoculados. La presencia de turbidez y alcalinización del medio, después de la incubación, indican la presencia de la enzima descarboxilasa en las cepas estudiadas.

- Utilización de Citrato:

Para esta prueba se utilizó el medio Citrato de Simmons (pH 6,9) en tubos de agar inclinados. La inoculación se realizó por picadura. La aparición de color azul intenso, después del periodo de incubación, indica un resultado positivo.

- Producción de indol:

Se realiza sembrando los aislados en caldo de triptona al 1% (Difco). Después del periodo de incubación se le adiciona unas gotas del reactivo de Kovacs (Kovacs, 1956). La aparición de un anillo de color rojo en la parte superior del tubo indica que el microorganismo es capaz de producir indol a partir del triptófano.

- Prueba de Voges-Proskauer:

Determina la capacidad de producir acetoina a partir de la fermentación de la glucosa. El medio utilizado fue el caldo base de Rojo Metilo-Voges Proskauer (RM-PV; pH 6,9. Difco) Después de la inoculación y tras el tiempo de incubación, se adicionan los siguientes reactivos: VP1 (α -naftol) y VP2 (KOH, 40%). El resultado se considera

positivo si al cabo de 10-15 min aparece una coloración marrón-rojiza en la parte superior del tubo.

- Producción de Ureasa:

Esta capacidad se determinó utilizando el medio Urea-Agar-Base (BBL). En las cepas positivas se produce un halo rojo-violeta alrededor de la zona de crecimiento.

- Reducción de Nitrato:

Se empleó el caldo Nitrato (Difco), tras el periodo de incubación se le adicionaron los reactivos α -naftilamina y ácido sulfanílico (0,8%). Si la bacteria realiza la reducción del nitrato a nitrito aparece una coloración rosada.

- Tolerancia a sales:

El estudio del requerimiento salino para el crecimiento de los aislados, se realizó utilizando el medio basal (MB) (Neopeptona, 4 g/l; extracto de levadura, 1 g/l; agar, 15 g/l) suplementados con concentraciones variables de NaCl (0, 3, 5, 8 y 10%).

- Detección de la caseinasa:

El medio utilizado fue el Agar Nutritivo (NA) adicionado con una concentración final del 2% de caseína. La preparación de este medio se realiza mezclando soluciones de doble concentración de leche descremada (4%) y de NA (3%) esterilizadas separadamente. La aparición de halos de aclaración alrededor de las colonias después del periodo de incubación se considera como resultado positivo.

- Detección de la gelatinasa:

Esta actividad se llevó a cabo en medio TSA suplementado con un 1% de gelatina. El revelado se efectuó añadiendo, sobre la superficie de las placas, unas gotas de una solución de cloruro mercuríco al 1% en agua destilada. La aparición de halos de aclaración alrededor de las colonias indica la positividad para este carácter.

- Detección de lipasas:

Se llevó a cabo utilizando el medio TSA suplementado con Tween 20 y Tween 80 a una concentración final de 1% (v/v). La aparición de halos opacos en torno a las colonias indica la producción de estas enzimas.

- Hidrólisis de almidón:

Esta prueba se realizó en placas de TSA suplementadas con un 0,4% de almidón. La aparición de halos de aclaración alrededor de las colonias indica la presencia de la enzima amilasa.

- Hidrólisis de la esculina:

El ensayo se realizó en placas de TSA suplementadas con un 0,1% del glucósido. Se considera un resultado positivo el ennegrecimiento del medio.

- Detección de la DNasa:

Se determinó en placas agar DNA. El revelado se realizó con HCl al 1%. La aparición de zonas de aclaración indica la presencia de la enzima desoxirribonucleasa.

- Producción de hemolisinas:

La actividad hemolítica se evaluó utilizando placas de AS comerciales (Oxoid). La presencia de halos de hemólisis alrededor de las zonas de crecimiento se considera un resultado positivo.

2.2. Sistemas miniaturizados: API 20NE y API ZYM

Para la utilización de estos sistemas comerciales: API 20NE Y API ZYM (BioMerieux) se siguieron las instrucciones de uso del fabricante, exceptuando la temperatura de incubación, que se realizó a 22-24°C. Con fines comparativos se realizaron suspensiones, por duplicado, de los distintos aislados en agua destilada, ajustándolos espectrofotométricamente a una densidad óptica de 1,0 a una absorbancia de 580 nm y con la escala McFarland a una densidad correspondiente al tubo nº4. Además

se evaluó la influencia del medio cultivo por lo que cada aislado se cultivó en los medios TSA-1 y AS y fueron ensayados en paralelo. La lectura de los resultados se realizó a las 48 h.

3. Sensibilidad a antibióticos y agentes quimioterápicos.

Los patrones de resistencia/sensibilidad de los distintos aislados a los agentes quimioterápicos utilizados normalmente en acuicultura se determinaron utilizando la técnica de difusión en placa con discos impregnados (Thornsberry, 1985), en placas de agar Muller-Hinton (MHA) (Difco). Las cepas se resuspendieron en PBS a una concentración de aproximadamente 10^9 bacterias/ml y se sembraron con un hisopo estéril sobre las placas. Después de 15 min de absorción se colocaron los discos comerciales (Oxoid) de los siguientes agentes antimicrobianos ($\mu\text{g}/\text{disco}$): Estreptomina (10), Ácido Oxolínico (10), Nitrofurantoína (300), Cloranfenicol (30), Norfloxacin (10), Enrofloxacin (5), Oxitetraciclina (30), Ampicilina (10) y Trimetoprim-sulfametoxazol (25). Tras el periodo de incubación (48 h a 22°C) la aparición de halos de inhibición del crecimiento alrededor de los discos, se consideró indicativo de la sensibilidad de esa cepa al agente antimicrobiano.

4. Caracterización serológica

4.1. Obtención de antisueros

Para la obtención de los antisueros empleados en este estudio se han utilizado las cepas de *P. anguilliseptica* CECT 899^T y TW-P1, procedente de anguila y aislada de dorada respectivamente (Tabla 4).

- Preparación de la suspensión de antígenos. Las cepas se cultivaron durante 48 h en AS y se inactivaron por adición del tampón FPBS (PBS + 0,7% de formaldehído) a la placa. La suspensión bacteriana se recoge y se transfiere a un tubo donde se deja actuar al formol

durante toda la noche a 4°C. Para eliminar los restos del formol, la mezcla se somete a un ciclo de dos centrifugaciones (10.000 rpm/5 min) resuspendiéndose siempre el sedimento en PBS estéril sin formol. Tras la segunda centrifugación, se resuspende nuevamente en PBS ajustándose a una densidad correspondiente al nº 4 de la escala McFarland (aproximadamente $1,2 \times 10^9$ células/ml). Se conserva a 4°C hasta su inoculación en conejos.

- Inmunización en conejos. Los antisueros se obtuvieron por inoculación en conejos de raza Nueva Zelanda de aproximadamente 2 Kg, siguiendo la metodología descrita por Sørensen & Larsen (1986).

La inoculación es por vía intravenosa en oreja, administrando cada tres días dosis crecientes de la suspensión bacteriana (0,2, 0,4, 0,8 y 1 ml). A la semana siguiente de la última inyección se extrajo el máximo volumen de sangre a los animales por aplicación de cánulas en la vena marginal de la oreja.

La sangre así obtenida, se dejó coagular a temperatura ambiente entre 1 y 2 h, toda la noche a 4°C y a continuación se extrajo el suero, que se centrifugó para eliminar los restos sólidos. El suero se conservó hasta su utilización a -20°C en alícuotas de 1 ml.

- Absorción de sueros. Se realizó una absorción cruzada de los sueros con la cepa heteróloga, es decir, el suero 899 de absorbió con la cepa TW-P1 y viceversa. Los antisueros absorbidos se prepararon mediante tres procesos de absorción a 37°C durante 2 h, el último de ellos seguidos por una incubación a 4°C durante 12 h. Las células utilizadas como antígeno de absorción, obtenidas por suspensión en solución salina (SS: 0,85% NaCl) de un cultivo fresco en placa, se lavaron tres veces por centrifugación y se resuspendieron en la misma solución a una concentración final de aproximadamente 10^9 bacterias/ml. Para cada paso de la absorción, se centrifugaron 500 µl de esta solución madre en una centrífuga eppendorf, resuspendiendo el precipitado celular resultante en el mismo volumen de antisuero (500 µl) Después de cada periodo de incubación, se separó el antisuero de las células por centrifugación. Finalmente el suero absorbido se mantuvo a -20°C hasta su utilización.

4.2. Métodos serológicos

En todos los ensayos serológicos se utilizaron tanto las células enteras como los antígenos O obtenidos siguiendo los protocolos indicados a continuación:

- Células bacterianas enteras. Las cepas bacterianas se incubaron durante 48 h en medio AS a 22-24°C. Las células se resuspendieron en tampón PBS ajustando por la escala McFarland a una concentración de 10^9 cél/ml (tubo nº4). Estas suspensiones se utilizaron como inmunógeno.

- Antígenos O termoestables. Las suspensiones bacterianas de cada una de las cepas en tampón PBS se calentaron a 100°C durante 1 h, para la obtención de los antígenos somáticos termoestables. Posteriormente se centrifugaron y resuspendieron en un volumen igual del mismo tampón.

4.2.1. Aglutinación en portaobjetos

La reacción de aglutinación se llevó a cabo mediante la mezcla de volúmenes iguales (20 µl) de soluciones de antígenos (tanto células enteras como antígeno O) y antisueros en un portaobjetos. Una aglutinación rápida y clara fue considerada como una reacción positiva, mientras que una débil y lenta se consideró negativa. En todos los ensayos se emplearon suspensiones bacterianas mezcladas con suero no inmune como controles negativos (Toranzo et al., 1987a).

4.2.2. Ensayos de microtitulación

Para determinar el título de aglutinación de cada antisuero frente a todas las cepas, se utilizaron placas de microtitulación de 96 pocillos, utilizando safranina (0,005% p/v en SS) para facilitar la lectura de las reacciones.

Se utilizó el siguiente protocolo:

Se adicionaron 20 µl de SS más safranina a todos los pocillos de la placa que van a ser utilizados, excepto al primero de la fila. Se hizo una dilución 1:10 del suero en SS y se añadieron 20 µl de esta dilución a los pocillos de la primera y segunda columna. A continuación se mezcló el contenido de los segundos pocillos con una micropipeta y se hicieron diluciones seriadas hasta el pocillo nº 24, retirando en este último 20 µl. A todos los pocillos se adicionaron 20 µl de las suspensiones de antígenos y se incubaron las placas durante una noche a 15°C.

El título del suero se expresa como el recíproco de la dilución correspondiente al pocillo en el que tiene lugar la última aglutinación visible.

4.2.3. Ensayo "Dot-Blot"

Se llevó a cabo con antígenos O y células enteras inactivadas con formol para evitar interferencias de la actividad fosfatasa propia de las bacterias, utilizando diferentes sueros frente a células enteras, así como los antisueros absorbidos. Para la inactivación se incubaron las cepas bacterianas durante 48h a 22-24°C en AS y se resuspendieron en 0,5 ml de tampón FPBS (PBS + 0,7% de formaldehído). Después de dejarlas reposar una hora a 4°C se realizaron dos lavados con SS y se resuspendieron en esta solución a una concentración bacteriana aproximada de 10⁹ bacterias/ml.

Antes de depositar las muestras en las membranas de ésteres de celulosa, éstas se sumergieron en tampón PBS para después dejarlas secar al aire. Una vez preparadas se depositaron 1,5 µl de las suspensiones bacterianas y se sumergieron durante 1 h aproximadamente en solución bloqueante (Tris-salino (TBS): 20 mM Tris-HCl, 500mM NaCl; (pH 7,5) suplementado con gelatina al 3% p/v). El siguiente paso fue realizar dos lavados con TTBS (TBS suplementado con Tween 20 al 0,05% v/v). Se incubaron, de nuevo, durante una hora con una solución del antisuero correspondiente (obtenido de conejo), diluido 1:1000 en tampón TBS conteniendo gelatina al 1 % en TBS. Se lavaron nuevamente con TTBS y se incubaron por última vez 1 h con suero comercial anti-inmunoglobulina G (IgG) de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Biorad) diluido 1:3000 en TBS con gelatina al 1% (p/v). Tras dos lavados con TTBS y uno con TBS se

realizó el revelado con tampón carbonato (0,1 M; pH 9,8) al que se le adicionó azul de tetrazolio (0,3 mg/ml) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (0,15 mg/ml) hasta el desarrollo de color. El revelado se detuvo por medio de baños de agua destilada.

5. Estudio de los componentes de la envoltura celular

5.1. Análisis de Lipopolisacáridos (LPS)

Los lipopolisacáridos de las cepas se extrajeron por el método de Hitchcock & Brown (1983), a partir de cultivos frescos de las cepas crecidas en AS durante un periodo de 48 h. Éstos se resuspendieron en tampón PBS (1,5 ml) y se centrifugaron durante 2 min a 12.000 rpm. Se desechó el sobrenadante y el sedimento bacteriano se resuspendió en 200 µl de PBS y se llevó a ebullición (100°C) durante 10 min. Las muestras se enfriaron en hielo y se incubaron con una solución de proteinasa K (2,5 mg/ml en PBS) durante 1 h en el baño a 60°C.

5.2. Análisis de proteínas de membrana externa y totales.

La extracción de las proteínas de membrana externa y totales se realizó según el método de Crosa & Hodges (1981). El procedimiento es el siguiente:

Se incubaron las cepas bacterianas a 22-24°C durante 48 h en 50 ml de medio líquido TSC-1. A continuación se centrifugaron a 10.000 rpm 10 min desechando los sobrenadantes y resuspendiendo las células en 3 ml de Tris-HCl (pH 8), suplementado con el 0,3% de NaCl. Se sonicaron con 5-6 pulsos de 1 min, transfiriendo los sobrenadantes a dos viales Eppendorf, uno para proteínas totales y otro para las de las membranas externas

Después de realizar una segunda centrifugación (1 min) para eliminar los posibles restos de células enteras se pasaron los sobrenadantes a nuevos tubos Eppendorf y éstos se centrifugaron durante 1 h a 17.000 rpm a 4°C, eliminándose los sobrenadantes.

A partir de este momento el proceso seguido para la purificación de los dos tipos de proteínas fue distinto. Para las proteínas totales, los precipitados se resuspendieron en

100 µl de agua destilada y se conservaron a -20°C hasta su uso. Para las proteínas de la membrana externa, los precipitados se resuspendieron en 100 µl de agua destilada y a esta suspensión acuosa se le añadió la misma cantidad de Sarkosyl (Lauril sarcosinato sódico) al 3% en Tris-HCl 20 mM (pH 8) y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. A continuación se centrifugaron a 17.000 rpm a 4°C durante 1 h. El sobrenadante se eliminó y el precipitado se resuspendió en 100 µl de agua destilada para almacenarlas a -20°C hasta su uso.

Para determinar la cantidad de proteínas, tanto externas como totales, extraídas y purificadas, utilizamos el método de Bradford (1976). Construyendo una recta patrón a partir de concentraciones crecientes de seroalbúmina bovina (5 a 100 µg/ml). A 100 µl de cada concentración de seroalbúmina, así como a cada una de las muestras y de agua destilada (tubo control) se añadieron 5 ml de reactivo Bradford (Bio-Rad). Una vez homogenizadas las muestras, se determinó la absorbancia a 595nm. La concentración de cada muestra se ajustó a 0,5-1 mg/ml por dilución en agua destilada estéril.

5.3. Electroforesis

Las muestras de LPS y de proteínas totales y de las membranas externas se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS siguiendo la técnica de Laemmli (1970), con una concentración final de acrilamida del 3% en Tris-HCl (0,125M, pH 6,8) en la parte concentradora (“Stacking gel”) y del 12% en Tris-HCl (1,5M, pH 8) en la porción separadora (“Running gel”). Como catalizadores para la polimerización de los geles se utilizaron TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamino) al 0,4% y persulfato amónico al 10%. El tampón de electroforesis empleado fue Tris-glicina (Tris-hidroximetil-aminometano 25 mM, glicina 0,192 M y dodecil sulfato sódico 0,1%). Las electroforesis se llevaron a cabo en una cubeta vertical, a 15 mM durante 15 h.

Inmediatamente antes de la electroforesis, a las muestras (15 µl tanto de proteínas como de LPS) se les adicionó el mismo volumen de tampón FSB 2X (Tris-HCl 0,065 M, pH 6,8; SDS 2% p/v; glicerol, 10% v/v; azul de bromofenol, 0,0001% p/v y β-mercaptoetanol, 5% v/v) y se llevaron a ebullición durante 5 min a 100°C .

El revelado de los geles se realizó siguiendo los procedimientos siguientes:

- Proteínas. Se realizó por tinción con azul de Coomassie (Sigma) al 0,05% en una solución acuosa de isopropanol (25%) y ácido acético (10%) durante 1 h y desteñido posteriormente con ácido acético al 5%

- Lipopolisacáridos. Se realizó por tinción con nitrato de plata según la técnica de Tsai y Frasch (1982). Después de la electroforesis, los geles se fijaron con una solución de etanol al 40% (v/v) y ácido acético al 5% (v/v) durante toda la noche. A continuación se oxidaron durante 5 min con la misma solución anterior a la que se le añadió ácido peryódico al 0,7% (p/v). Después de lavar los geles con agua destilada tres veces durante 15 min cada vez, se tiñeron durante 10 min con una solución compuesta por 2 ml de NH₄OH, 28 ml de NaOH 0,1 N y 5 ml de Ag NO₃ al 20% (p/v) en 115 ml de agua destilada. Se lavaron nuevamente con agua destilada y se le añadió la solución reveladora (50 mg de ácido cítrico y 0,5 ml de formaldehído por litro). La tinción se detuvo al reemplazar la solución reveladora por metanol al 50% (v/v).

5.4. Transferencia electroforética a membranas de nitrocelulosa y “Western-blot” de lipopolisacáridos y proteínas

El ensayo de transferencia electroforética de proteínas de membrana externa y LPS a papel de nitrocelulosa se realizó mediante el procedimiento de Towbin et al. (1979).

Después de separarlos utilizando geles de poliacrilamida-SDS, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa mediante electroforesis a 0,3 A durante 4 h utilizando como tampón de transferencia Tris-glicina-metanol (Tris-HCl, 25mM; glicina, 192 mM; metanol, 20%; pH 8,3). A continuación las membranas se sometieron a los mismos tratamientos que en caso del ensayo de “dot-blot” (ver apartado 3.1.3.2). Los sueros utilizados para la primera incubación fueron los obtenidos frente a las cepas CECT 899^T y TW-P1.

6. Caracterización molecular. Estudio de la variabilidad intraespecífica existente en los aislados de *P. anguilliseptica*.

6.1. Análisis de plásmidos

El contenido plasmídico de los aislados se determinó por dos técnicas distintas, el método de Kado & Liu (1981) modificado por Toranzo et al. (1983a) y el procedimiento descrito por Birnboim & Doly (1979). Además también se ensayó la variante simplificada de este último método. Para llevar a cabo estas extracciones se cultivaron las células a 22°C durante 48 h en AS.

La técnica de Kado & Liu (1981) se basa en la desnaturalización del DNA del genóforo por la acción del detergente alcalino SDS a elevadas temperaturas. El protocolo seguido fue el siguiente:

Las células se resuspendieron en SS y se centrifugaron a 120000 rpm durante 5 min, los sedimentos se dejaron secar al aire y se les añadió 60 µl de la solución de lisis (Tris 59 mM; pH 12,4; SDS 3%), se resuspendieron y se incubaron a 56°C durante 45 min. El siguiente paso fue adicionar un volumen igual de fenol:cloroformo (1:1, v/v), y tras una agitación suave hasta que se forma una emulsión, se sometieron a una centrifugación a 12.000 rpm durante 10 min. La fase acuosa superior, se transfirió a otros tubos, a los que se les adiciona 10 µl de la solución estabilizadora (0,25% púrpura de bromocresol, 50% glicerol en Tris-acetato 50 mM, pH 7,9).

En el método Birnboim & Doly (1979) la ruptura celular se produce por la adición de lisozima (5 mg/ml) (Sigma) a la solución de lisis (glucosa 50 mM; EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM; pH 8,0). Las células se resuspenden en 100 µl de esta suspensión y se incuban 5 min a temperatura ambiente. Seguidamente se añaden 200 µl de una solución de SDS al 1% en NaOH 2N y se mantienen en hielo otros 5 min añadiendo a continuación 150 µl de acetato potásico 5M (pH 4,8). Después de 5 min en hielo, se centrifuga durante 5 min a 12.000 rpm, se transfiere el sobrenadante a un nuevo vial y se añade un volumen igual de fenol:cloroformo (1:1, v/v). Se centrifuga de nuevo durante 2 min. El

sobrenadante obtenido se transfiere a otro vial y se le adiciona un volumen de etanol equivalente a 2 veces el sobrenadante, se espera 2 min y se centrifuga nuevamente. El sobrenadante se desecha y el sedimento se lava por centrifugación con 1 ml de etanol al 70% frío. El precipitado así obtenido se seca y resuspende en 40 µl solución estabilizadora utilizada en el método anterior.

El método de Birnboin simplificado (mini Birnboin) se empleó con ligeras modificaciones como se describe a continuación: Los sedimentos bacterianos obtenidos por centrifugación (5 min a 12000 rpm) se resuspendieron en 200 µl de solución de lisis, con una concentración mayor de lisozima (10 mg/ml). A continuación se añadieron 200 µl de la solución 2 (SDS 10%; NaOH 10N), y se agitaron por inversión, inmediatamente se adicionó el mismo volumen de la solución 3 (acetato sódico 3M), se agitó, de nuevo, y se mantuvieron en hielo durante 30 min. A continuación, se centrifugó a 12.000 rpm y el sobrenadante resultante se transfirió a otro vial, añadiéndole 240 µl de isopropanol. Tras 15 min a temperatura ambiente, se centrifugó de nuevo y se desechó el sobrenadante, dejando secar bien al aire el precipitado que se resuspendió finalmente en 30 µl de TAE.

Las muestras obtenidas por estos procedimientos se sometieron a electroforesis en cubeta horizontal, empleando geles de agarosa al 1,2% con 40 µl de bromuro de etidio (Tris 0,05M; NaOH 0,005M; NaCl 0,05M, pH 8.0) a un voltaje de 100V. El DNA plasmídico se visualizó con un transiluminador de luz ultravioleta. En todas las electroforesis se incluyeron como marcadores de peso molecular los plásmidos de la cepa V517 de *E. coli* (entre 1,4 y 35,8 MDa). La masa molecular de las partículas de DNA extracromosómico se estimó mediante la construcción de una recta de calibrado, definida por la movilidad relativa de los plásmidos de referencia con respecto a la banda cromosómica frente al logaritmo de su masa molecular.

Después de la extracción se realizó un tratamiento de restricción con el enzima EcoR1. A 10 µl de la suspensión de plásmidos extraídos por el método mini-Birnboin se le añadió 1 µl del tampón del enzima (50 mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1

mM Dithioerythritol, pH 7.5) y 0,5 µl de enzima y se incubó en baño a 37°C durante 2-3 h.

6.2. RAPD

El análisis por RAPD (amplificación aleatoria de DNA) es una técnica rápida y efectiva, que se basa en la utilización de cebadores arbitrarios en la técnica de PCR. Este fue uno de los ensayos que se utilizó en este trabajo para el estudio de la variabilidad intraespecífica existente dentro de la especie de *P. anguilliseptica*. Para su realización se utilizó el kit comercial Ready-To-Go™ RAPD-beads (Amersham Pharmacia Biotech). Este kit está compuesto por un set de 6 cebadores y una serie de viales, los cuales contienen todo lo necesario para la amplificación, excepto el DNA.

6.2.1. Extracción de DNA.

La extracción de DNA se realizó a partir de cultivos puros empleando el sistema comercial InstaGene Matriz (Biorad).

Las cepas bacterianas se incubaron durante 48 h en medio AS a 22°C. Las células se resuspendieron en 1 ml de agua destilada estéril y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 1 min, desechando el sobrenadante. Posteriormente, se añadieron 200 µl de la matriz InstaGene y se incubó durante 30 min a 56°C. Después del periodo de incubación las muestras se agitaron a alta velocidad durante 10 s y se calentaron a 100°C durante 8 min. Se agitó de nuevo con el vortex y, por último, se centrifugaron 2-3 min a 12.000 rpm. El preparado se conservó hasta su uso a -20 °C.

6.2.2. Selección de cebadores.

Para los ensayos de optimización del protocolo de RAPD, se eligieron dos aislados de *P. anguilliseptica* (TW-P1 y CECT 899^T) con distinto origen geográfico y de hospedador. Los 6 cebadores del kit se ensayaron con ambos aislados, para elegir, de esta forma, cuál de ellos era el más adecuado para el tipado de las cepas del estudio. Además también se varió la cantidad de DNA utilizada en cada reacción, para determinar cual era

la concentración óptima que se debía utilizar para este ensayo. Una vez determinado el cebador y la concentración de DNA se realizaron la técnica con todos los aislados de este trabajo. Añadiendo a cada uno de los viales de este sistema: 1 µl de ADN, 19 µl de agua destilada estéril y 5 µl de cebador.

Como el protocolo de esta técnica ya se había puesto a punto en nuestro laboratorio (Romalde et al., 1999b), las condiciones de PCR fueron las siguientes: una fase de desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de amplificación consistentes en desnaturalización (95°C), hibridación (35°C) y elongación (72°C). El último paso consistió en una elongación final de 72°C durante 5 min.

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Desnaturalización inicial	95	5
35	Desnaturalización	1
	Hibridación	1
	Elongación	2
Elongación final	72	5

Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa horizontal 1% (p/v) en tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE) (Sambrook et al, 1989), con 40 µl de bromuro de etidio. Las condiciones de la electroforesis fueron de 100 V durante 1,5 h. Las bandas se visualizaron con un transiluminador de ultravioleta. Para poder determinar el peso molecular del fragmento obtenido, se utilizó un marcador de PM de 50-2000 pares de bases (Sigma)

6.3. ERIC y REP-PCR

Para profundizar en el estudio de la diversidad genética intraespecífica de *P. anguilliseptica*, se realizaron dos ensayos: ERIC-PCR (secuencias consenso intergénicas de enterobacterias) y REP-PCR (secuencias palindrómicas extragénicas).

El estudio de la distribución de los elementos ERIC y REP (Hulton et al, 1991; Stern et al, 1984) se examinaron utilizándose la técnica de PCR y con cebadores específicos para estas secuencias repetitivas que se encuentran a lo largo del genoma (Versalovic et al., 1991):

ERIC1R	5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'
ERIC2	5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'
REP1R	5'-IIICGICGICATCIGGC-3'
REP2	5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'

El DNA utilizado en estos ensayos se extrajo del mismo modo que en el caso anterior (RAPD), y las reacciones de amplificación se realizaron utilizando el sistema comercial Ready to go™ PCR beads (Amersham Pharmacia Biotech). Los viales de este sistema ya contienen todos los reactivos necesarios para la amplificación, excepto el DNA y los cebadores. Por lo que a cada uno se le añadió: 1 µl de DNA, 1 µl de cada uno de los cebadores y 22 µl de agua destilada estéril.

Los ensayos se realizaron con todas las cepas del estudio y los programas de PCR utilizados fueron los siguientes (de Bruijin, 1992):

ERIC:

	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
	Desnaturalización inicial	94	7
	Desnaturalización	90	0,5
30	Hibridación	52	1
	Elongación	52	1
	Elongación final	65	8

REP:

	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
	Desnaturalización inicial	95	7
	Desnaturalización	94	1
30	Hibridación	44	1
	Elongación	65	8
	Elongación final	65	15

El análisis de los productos de PCR se realizó por electroforesis en geles de agarosa, en las mismas condiciones que en el ensayo descrito con anterioridad.

RESULTADOS

Los peces, doradas, rodaballos y besugos, a partir de los que se aislaron las cepas españolas de *P. anguilliseptica* incluidas en este estudio no presentaban lesiones externas importantes. Los únicos signos resaltables fueron algunas zonas de aclaramiento próximas al área peritoneal y la base de la cabeza (Fig 1). El examen de los órganos internos mostró la presencia de gran cantidad de líquido ascítico, hígado pálido y hemorrágico y riñón licuado.

Se realizó un análisis bacteriológico y se obtuvo crecimiento bacteriano a partir de los órganos internos examinados, consiguiéndose un mejor crecimiento en agar sangre (AS).

En todos los casos, los aislados se seleccionaron como presuntas *P. anguilliseptica* por ser bacilos, Gram-negativos, móviles, oxidasa y catalasa positivos, β -galactosidasa e indol negativos. Características que compartían con las cepas de referencia de la especie utilizadas en este estudio.

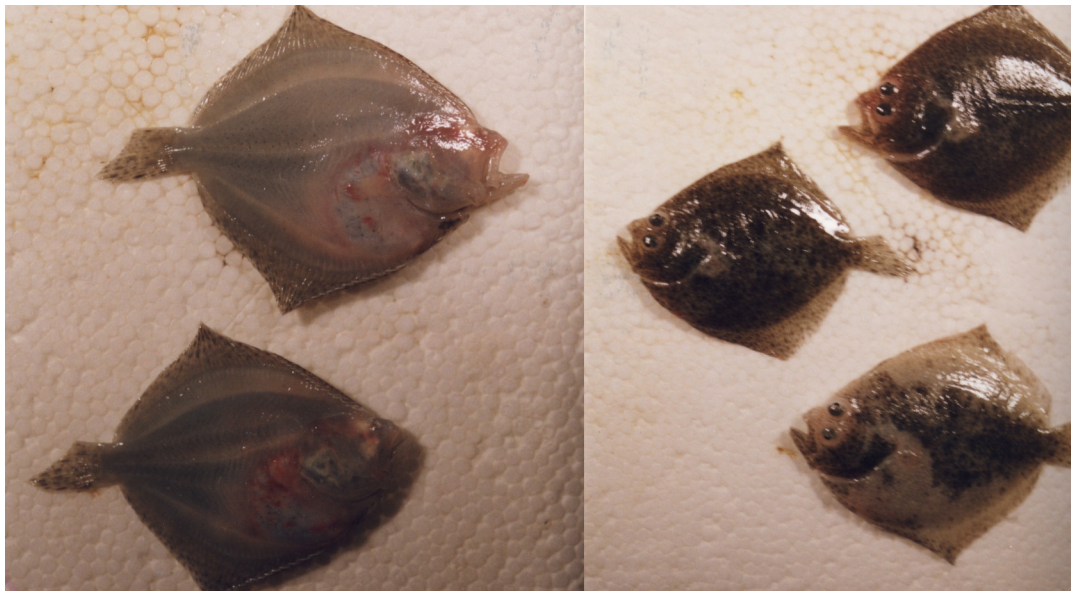


Fig. 1.- Sintomatología externa observada en los rodaballos afectados de pseudomoniasis.

1. Caracterización bioquímica

Se realizaron pruebas bioquímicas y fisiológicas, empleando tanto las cepas de estudio como las de referencia. En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos para las diferentes pruebas en comparación con los de descripciones anteriores de *P. anguilliseptica*.

En la mayoría de las pruebas los resultados obtenidos con las cepas del estudio eran coincidentes con los descritos para las cepas de referencia. Las únicas discrepancias se observaron para algunos de los aislados españoles en las pruebas de descarboxilación de aminoácidos, hidrólisis de almidón, crecimiento a 4°C y crecimiento a 0% y 3% de NaCl.

Excepto el aislado PC 468.1, cuyo perfil fenotípico no se correspondió con el descrito para este patógeno de peces y que, consecuentemente, fue eliminado de los estudios realizados con posterioridad, los resultados obtenidos para el resto de aislados españoles de dorada, rodaballo y besugo nos permitieron confirmar que todos ellos pertenecían a la especie *P. anguilliseptica*.

2. Análisis por los sistemas API 20NE y API ZYM

Los resultados obtenidos en la caracterización de los aislados mediante el sistema miniaturizado API 20NE fueron dependientes del medio de cultivo utilizado TSA-1 o Agar Sangre (AS), y del método empleado para ajustar la concentración del inóculo bacteriano.

Sólo cuando las bacterias se cultivaron en medio AS y la concentración del inóculo se ajustó electroforéticamente a una densidad óptica de 1,0 a una absorbancia de 580 nm, se obtuvieron resultados constantes y reproducibles.

De hecho, en esas condiciones, los perfiles obtenidos con todas las cepas con el sistema API 20 NE fueron bastante homogéneos, resultando variable sólo la prueba de la asimilación del caprato, y la descarboxilación de la arginina. En esta última se observaron en un 50% de los casos reacciones negativas falsas, ya que por otros métodos (medio Arginina de Thornley) el resultado es positivo.

Tabla 5.- Comparación de las características de *P. anguilliseptica* en las descripciones publicadas por diferentes investigadores^a.

PRUEBA	Presente trabajo^b	Descripciones anteriores^c
Gram	- (0)	-
Morfología	B	B/BL/F
Movilidad	+ (100)	+
Oxidasa	+ (100)	+
Catalasa	+ (100)	+
O/F	O	O
Hemólisis	- (0)	-
ADH	NC	V
LDC	NC	-
ODC	NC	-
ONPG	- (0)	-
H ₂ S	- (0)	-
Indol	- (0)	-
V.P	- (0)	-
Reducción de Nitrato	- (0)	-
Citrato	V (12)	V
Ureasa	- (0)	-
Gelatinasa	- (0)	V
Caseinasa	+ (100)	V
Hidrólisis de Esculina	- (0)	-
Tween 20	V (60)	+
Tween 80	- (0)	V
Hidrólisis de Almidón	V (24)	-
DNasa	+ (100)	V
Crecimiento a:		
4°C	V (7)	+
10–30°C	+ (100)	+
37°C	V (10)	-
Crecimiento en:		
0%	- (0)	+
1–2%	+	+
3%	V (8)	+
>4%	- (0)	-

^a +, resultado positivo; -, resultado negativo; V, resultado variable entre aislados; NC, no cambio; B, bacilo; BL, bacilo largo; F, filamento; O, metabolismo oxidativo

^b En paréntesis se muestra en porcentaje de cepas positivas para cada carácter estudiado.

^c Datos obtenidos de las referencias incluidas en la Tabla 3 (ver introducción)

Se obtuvieron cuatro perfiles diferentes, dependiendo de los resultados de las pruebas variables: 0100055 (24 aislados), 0000055 (18 aislados), 0100045 (2 aislados) y 0000045 (8 aislados).

Al no estar incluida *P. anguilliseptica* en la base de datos del API, los aislados fueron identificados como *P. pseudoalcaligens* (identificación 0100055 y 0000055) o *Brevundimonas diminuta* (0100045 y 0000045).

En el caso del sistema API ZYM los resultados fueron totalmente homogéneos, observándose distintas intensidades en el código de color para las actividades enzimáticas. Las actividades detectadas en todos los aislados del estudio fueron: fosfatasa alcalina, esterasa, esterasa lipasa, leucina arilamidasa, fosfatasa ácida y naftol-AS-BI-fosfohidrolasa. Al igual que en el sistema API anterior, la reproducibilidad de los resultados se obtuvo cuando los inóculos fueron preparados a partir de bacterias crecidas en AS y ajustado espectrofotométricamente a una densidad óptica de 1,0 a 580 nm.

3. Patrón de resistencia a agentes antimicrobianos.

Se observó la existencia de tres patrones de resistencia/sensibilidad (Tabla 6) en las cepas de *P. anguilliseptica*. El patrón A, formado por cepas sensibles a todos los agentes quimioterápicos ensayados; el patrón B, que incluía aquellos aislados con resistencia al trimetoprim sulfametoxazol; y el patrón C, formado por dos cepas (la cepa JIP 02/92 aislada de dorada en Francia y la cepa W 12-91 aislada de arenque en Finlandia), que mostraron además resistencia a la ampicilina.

4. Caracterización serológica

4.1. Ensayos de aglutinación en portaobjetos

En estos casos se utilizaron los antisueros obtenidos con las cepas CECT 899^T (anguila japonesa) y TW-P1 (dorada).

No todas las cepas reaccionaron de la misma forma ante ambos antisueros. Cuando la reacción se realizó con las células enteras se pudieron distinguir tres grupos, uno de 4 cepas que reaccionaba con el suero anti-CECT 899 otro con el anti-TW-P1, que incluía a 38 cepas y por último un grupo que reaccionaba con ambos sueros y que comprendía a 9 cepas (Tabla 7).

En cambio si las reacciones de aglutinación se realizaba con el antígeno O termoestable, se distinguían únicamente dos grupos (Tabla 8 y Fig. 2), el primero que incluía 6 aislados (CECT 899, CECT 901, JIP 36/90(3), 910315-1/1, 970129-2/3 y LD 4.3) y el segundo que agrupaba al resto de las cepas, incluyendo todos los aislados españoles con la excepción del aislado de rodaballo LD 4.3.

Al realizar el ensayo con células totales, se observaron algunas reacciones cruzadas con cepas de referencia de especies relacionadas con el género *Pseudomonas*, como *P. fluorescens*, *P. stutzari*, *Brevundimonas diminuta*, *Marinomonas vaga* o *Deleya venusta*, que se eliminaron cuando se analizaron los antígenos O termoestables (Tabla 9).

4.2. Microtitulación

Se realizó el ensayo de aglutinación en placas de microtitulación empleando diluciones seriadas de cada uno de los antisueros, para confirmar los resultados obtenidos con el ensayo de aglutinación en portaobjetos. El título de cada antisuero con el respectivo antígeno, se consideró como el recíproco de la mayor dilución del antisuero que da una reacción positiva después de un periodo de incubación de 12 h a 15°C.

Los resultados confirmaron la existencia de dos grupos serológicos, ya que las cepas pudieron agruparse en dos grupos diferentes en función de su título de aglutinación (Tabla 10), coincidentes con los establecidos mediante la técnica de aglutinación en portaobjetos. Así, los aislados del grupo de la cepa CECT 899^T, mostraron títulos superiores a 512 con el antisuero 899 e inferiores a 256 con el antisuero TWP1. Del mismo modo, los aislados del grupo TWP1 mostraron títulos superiores a 1024 con su suero homólogo e inferiores a 256 con el suero 899.

Tabla.- 6.- Patrones de sensibilidad/resistencia obtenidos con las cepas de *P. anguilliseptica* para los antimicrobianos ensayados.

Patrón	Hospedador	Nº de cepas	Agentes quimioterápicos								
			Amp	C	OT	S	OA	Nor	Enr	F	SXT
A	Dorada	9	S (32-40)	S (35-50)	S (31-60)	S (20-40)	S (30-50)	S (40-60)	S (30-60)	S (25-41)	S (20-50)
	Rodaballo	8	S (20-40)	S (30-60)	S (30-60)	S (30-50)	S (20-50)	S (35-60)	S (34-60)	S (30-40)	S (20-44)
	Anguila	3	S (20-40)	S (40-60)	S (40-54)	S (28-30)	S (40-50)	S (50-60)	S (50-60)	S (30-40)	S (24-40)
	Trucha común	1	S (40)	S (30)	S (40)	S (30)	S (40)	S (50)	S (50)	S (30)	S (25)
B	Dorada	9	S (32-40)	S (32-40)	S (32-40)	S (32-40)	S (32-40)	S (32-40)	S (32-40)	S (32-40)	R
	Rodaballo	8	S (20-40)	S (30-60)	S (30-60)	S (30-50)	S (20-50)	S (35-60)	S (34-60)	S (30-40)	R
	Anguila	4	S (30-40)	S (35-40)	S (30-40)	S (30-40)	S (40-45)	S (30-40)	S (35-50)	S (25-30)	R
	Besugo	2	S (40)	S (35-40)	S (40-45)	S (40)	S (35-40)	S (40)	S (40-45)	S (30-35)	R
	Lubina	1	S (50)	S (60)	S (60)	S (30)	S (44)	S (60)	S (60)	S (40)	R
	Trucha arcoiris	2	S (40)	S (30)	S (30-40)	S (30)	S (40)	S (35-40)	S (40-45)	S (30-35)	R
	Salmón	1	S (40)	S (30)	S (40)	S (30)	S (40)	S (35)	S (45)	S (35)	R
C	Dorada	1	R	S (60)	S (50)	S (30)	S (50)	S (60)	S (60)	S (40)	R
	Arenque	1	R	S (60)	S (50)	S (20)	S (40)	S (60)	S (60)	S (40)	R

Tabla 7. Caracterización serológica de las cepas de *P. anguilliseptica* mediante ensayos de aglutinación en portaobjetos utilizando células bacterianas enteras^a.

Nº de Cepas	Hospedador	Sueros frente a las cepas	
		CECT 899	TW-P1
13	Dorada	–	++
16	Rodaballo	–	++
2	Besugo	–	++
1	Lubina	–	++
1	Arenque	–	++
3	Salmónidos	–	++
2	Anguila	–	++
4	Anguila	++	–
6	Dorada	+	++
1	Rodaballo	++	+
1	Anguila	(+)	(+)

^a ++, reacción positiva fuerte; +, reacción débil; (+), reacción muy débil y lenta; –, reacción negativa

Tabla 8.- Caracterización serológica de las cepas de *P. anguilliseptica* mediante ensayos de aglutinación en portaobjetos utilizando los antígenos O termoestables de la especie^a.

Cepas	Sueros frente a las cepas		Cepas	Sueros frente a las cepas	
	CECT 899	TW-P1		CECT 899	TW-P1
75/98.1	–	++	RPM 733.1	–	++
99/50	–	++	AZ 208.1	–	++
TW-P1	–	++	AZ 208.2	–	++
TW-P2	–	++	AZ 209.1	–	++
TW-P3	–	++	AZ 209.2	–	++
TW 7	–	++	AZ 210.1	–	++
TW 444	–	++	AZ 210.2	–	++
TW 47-L-1	–	++	AZ 211.1	–	++
9/02 J.1	–	++	AZ 211.2	–	++
9/02 J.3	–	++	TW 10/03	–	++
C 224	–	++	CI 3.1	–	++
C 225	–	++	LPAA 11705	–	++
C 9043	–	++	JIP 02/92(2)	–	++
35-L3	–	++	LPAA 11066	–	++
35-L4	–	++	W 12.91	–	++
JIP 14/91	–	++	P 40B/91	–	++
JIP 24/91	–	++	P 14B/94	–	++
JIP 02/92	–	++	P 32/00	–	++
LD 4.3	++	–	P 19/00	–	++
RQ 171.1	–	++	CECT 899	++	–
RQ 174.1	–	++	CECT 901	++	–
RQ 174.2	–	++	JIP 36/90(3)	++	–
RQ 175.1	–	++	910315-1/1	++	–
AZ 196.1	–	++	910315-1/6	–	++
AZ 197.1	–	++	970129-2/2	–	++
			970129-2/3	++	–

^a ++, reacción positiva; –, reacción negativa

Caracterización de *P. anguilliseptica*

Tabla 9.- Resultados de las reacciones cruzadas de *P. anguilliseptica* y especies relacionadas utilizando aglutinación en portaobjetos con células enteras y los antígenos O termoestables^a.

Cepa	Célula entera		Antígeno O termoestable	
	CECT 899	TWP1	CECT 899	TWP1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(+)	–	–	–
<i>P. fluorescens</i>	+	(+)	(+)	–
<i>P. stutzeri</i>	+	+	–	(+)
<i>P. doudorofii</i>	–	–	–	–
<i>Pseudomonas sp.</i>	+	–	–	–
<i>Brevundimonas diminuta</i>	(+)	(+)	(+)	–
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	–	+	–	(+)
<i>Marinomonas vaga</i>	(+)	+	–	–
<i>Halomonas aquamarina</i>	–	–	–	–
<i>Deleya venusta</i>	+	–	–	–
<i>Aeromonas media</i>	–	(+)	–	–

^a +, reacción débil; (+), reacción muy débil y lenta; –, reacción negativa

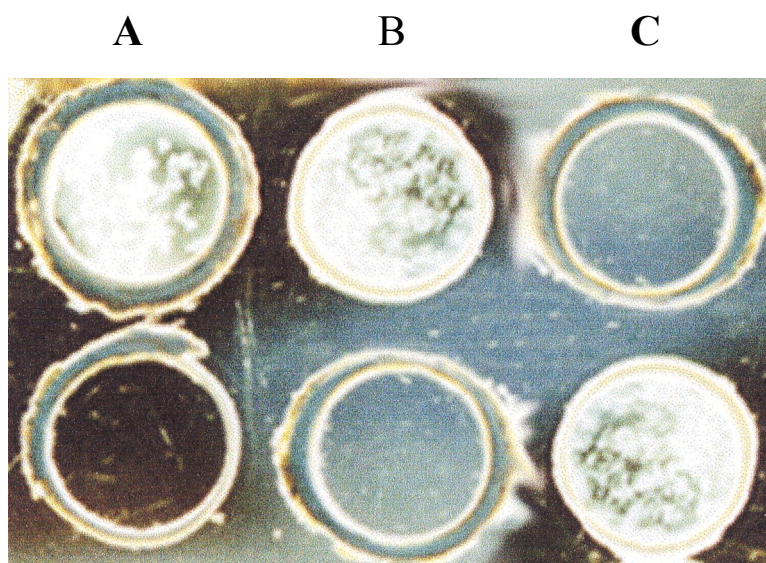


Fig. 2.- Reacción observada con distintos aislados de *P. anguilliseptica* (antígenos O) y los sueros frente a las cepas TW-P1 (línea superior) y 899 (línea inferior). Columnas: A, TW-P1; B, RQ 171.1; C, LD 4.3.

Tabla 10.- Resultados de las reacciones de microaglutinación utilizando las células enteras y los antígenos O de cepas de *P. anguilliseptica*

Cepa	Antisuero			
	899		TW-P1	
	Cel ^a	AO	Cel	AO
75/98.1	32 ^b	4	2048	4096
TW-P1	32	4	2048	4096
LD 4.3	512	1024	8	2
RQ 171.1	64	4	1024	2048
CECT 899	2048	4096	256	2
CECT 901	512	4096	256	2
LPAA 11705	8	2	512	2048

^a Cel, célula entera; AO, antígeno O.

^b El título se expresa como recíproco de la mayor dilución donde se observó aglutinación.

4.3. “Dot blot”

Los resultados obtenidos en los ensayos de “dot blot” utilizando los antisueros 899 y TWP1 confirmaron también la existencia de dos grupos serológicos dependientes del antígeno O termoestable. La distribución de los aislados en los dos grupos coincidió plenamente con la observada mediante las técnicas de aglutinación en portaobjetos y microaglutinación.

Cuando se emplean células enteras (Fig. 3), aunque se pudo apreciar alguna diferencia en la intensidad de la reacción, la discriminación de ambos grupos no fue posible ya que el “dot blot” es un método cualitativo, no cuantitativo, y todos los aislados mostraron reacción positiva con ambos sueros.

Los dos grupos se pusieron de manifiesto cuando se emplearon los antígenos O, observándose una reacción fuerte de las cepas de cada grupo con su antisuero homólogo, y débil con el antisuero heterólogo. (Fig. 4).

La utilización de antígenos O y antisueros absorbidos permitió la diferenciación clara de ambos grupos serológicos, ya que los aislados reaccionaron únicamente con su antisuero homólogo, eliminándose las reacciones cruzadas con el antisuero heterólogo (Fig. 5).

4.4. Patrón de lipopolisacáridos.

Con objeto de conocer la homología entre cepas se estudió el patrón de lipopolisacáridos, ya que éstos parecen ser los determinantes de la existencia de distintos serotipos.

Los resultados obtenidos en el análisis de los LPS, mostraron la existencia de dos perfiles electroforéticos distintos (Fig. 6) en función de la migración diferencial de las cadenas O de dichas moléculas. Así, un perfil se caracterizó por la presencia de cadenas O de alto peso molecular, mientras que el otro patrón mostró un número mayor de bandas con un rango de peso molecular más amplio (Fig. 6).

IV. DETECCIÓN DE *P. anguilliseptica* POR PCR

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Desarrollo de un protocolo específico para la detección de *P. anguilliseptica*.

1.1. Cepas utilizadas.

En este capítulo se utilizaron el total de 50 cepas de *P. anguilliseptica* incluidas en la presente memoria (Tabla 4)(ver capítulo III). Además, para la validación del método de PCR diseñado, se utilizaron también cepas pertenecientes a otras especies de *Pseudomonas*, así como diferentes aislados de patógenos de peces Gram-positivos y Gram-negativos (Tabla 12).

Tabla 12.- Cepas utilizadas en este estudio para la validación del método de PCR

Organismo	Cepa	Referencia^a
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	ATCC
<i>P. fluorescens</i>	ATCC 13525	ATCC
<i>P. putida</i>	CECT 324	CECT
<i>P. chlororaphis</i>	CECT 4470	CECT
<i>P. stutzeri</i>	ATCC 17588	ATCC
<i>P. doudorofii</i>	NCIMB 1965	NCIMB
<i>Pseudomonas sp. marina</i>	RPM 46.2	Colección del laboratorio
<i>Pseudomonas sp. marina</i>	RPM 48.1	Colección del laboratorio
<i>Pseudomonas sp. marina</i>	RM 98.2	Colección del laboratorio
<i>Pseudomonas sp. marina</i>	RM 108.2	Colección del laboratorio
<i>Pseudomonas sp. marina</i>	RM 157.1	Colección del laboratorio
<i>Pseudomonas sp. marina</i>	RM 158.1	Colección del laboratorio
<i>Pseudomonas sp. marina</i>	RA 25.1	Colección del laboratorio
<i>Pseudomonas sp. marina</i>	RP 20.1	Colección del laboratorio
<i>Brevundimonas diminuta</i>	CECT 317	CECT

Tabla 12.- Cont.

<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	DSMZ 50418	DSMZ
<i>Halomonas aquamarina</i>	NCIMB 557	NCIMB
<i>Alteromonas haloplanktis</i>	ATCC 19855	ATCC
<i>Deleya venusta</i>	NCIMB 1979	NCIMB
<i>Deleya pacifica</i>	ATCC 27122	ATCC
<i>Marinomonas vaga</i>	NCIMB 1962	NCIMB
<i>Aeromonas media</i>	ATCC 33907	ATCC
Patógenos de peces		
<i>Listonella anguillarum</i>	RQ 183.1	Colección del laboratorio
<i>L. pelagius</i>	PC 376.1	Colección del laboratorio
<i>Vibrio alginolyticus</i>	PC 376.1	Colección del laboratorio
<i>V. harveyi</i>	TW 425.1	Colección del laboratorio
<i>V. splendidus</i>	PC 400.1	Colección del laboratorio
<i>V. vulnificus</i>		Colección del laboratorio
<i>Photobacterium damsela</i> :		
<i>subsp. damsela</i>	TW 348	Colección del laboratorio
<i>subsp. piscicida</i>	DI 2.1	Colección de laboratorio
<i>Aeromonas salmonicida</i>	RPS 71	Colección del laboratorio
<i>Yersinia ruckeri</i>	TW 330	Colección del laboratorio
<i>Edwardsiella tarda</i>	FP-17-99	Colección del laboratorio
<i>E. ictaluri</i>	ATCC 33202	ATCC
<i>Lactococcus garvieae</i>	TW 446.B3	Colección del laboratorio
<i>Streptococcus parauberis</i>	RA 99.1	Colección del laboratorio
<i>S. iniae</i>	ATCC 29178	ATCC
<i>Renibacterium salmoninarum</i>	ATCC 33209	ATCC
<i>Carnobacterium piscicola</i>	PT-31	Colección del laboratorio

^aATCC, Colección Americana de Cultivos Tipo; CECT, Colección Española de Cultivos Tipo; NCIMB, Colección Nacional de Bacterias Marinas e Industriales; DSMZ, Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares.

1.2. Extracción de DNA

El DNA bacteriano se obtuvo a partir de cultivos puros mediante el sistema comercial InstaGene Matrix (Bio-Rad), descrito previamente en el apartado 6.2.1 del capítulo III del presente trabajo.

1.3. Selección de cebadores

El diseño de cebadores se realizó a partir de la secuencia del gen 16S rRNA de *P. anguilliseptica*. Esta secuencia se obtuvo de la base de datos Genbank (Nº de acceso X99540) y se comparó con otras homólogas con el programa Mega-Blast para descartar la posibilidad de que secuencias similares pudieran encontrarse en otras especies bacterianas. En base a esto se escogieron dos regiones que mostraban una alta variabilidad en el género *Pseudomonas*, sirviéndonos para el diseño de una pareja de cebadores específicos, que son los siguientes:

Directo: Psang 1 con secuencia 5'- TTGGGAGGAAGGGCAGTAAC-3'

(20-mer; posiciones 410 a 429 en el gen 16S rRNA de *Escherichia coli*)

Reverso: Psang 3 con secuencias 5'- TGCGCCACTAAAATCTCAA-3'

(19-mer; posiciones 809 a 827).

Estos cebadores flanquean un fragmento de 418 pares de bases del gen 16S rRNA.

1.4. Optimización del método

Para los ensayos de optimización del protocolo de PCR se utilizó el DNA extraído de la cepa tipo CECT 899^T de *P. anguilliseptica*. Además con fines comparativos se incluyeron otros aislados pertenecientes al género *Pseudomonas*, como *P. aeruginosa* y *P. chlororaphis*.

Para optimizar las condiciones térmicas que posibilitasen la detección específica de *P. anguilliseptica* se utilizó un termociclador con gradiente de temperatura (Biometra, Alemania). Las reacciones de amplificación se realizaron utilizando el sistema comercial Ready-to-go[®] PCR beads. A cada uno de los viales de este kit se le añadió, 1 µl de cebador Psang 1 (2 nM), 1 µl de cebador Psang 3 (2 nM), 1 µl de DNA y 22 µl de agua destilada estéril.

Las condiciones de PCR estudiadas fueron: una fase de desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min, seguido de 35 ciclos de amplificación consistentes en desnaturalización (94°C), hibridación (“annealing”) (se ensayó el rango de 52 a 68°C) y elongación (72°C). El último paso consistió en una elongación final a una temperatura de 72°C y de 5 min de duración. Además, se ensayaron distintos tiempos para las fases de desnaturalización e hibridación y elongación. Para los dos primeros el rango evaluado fue de 20 a 60 s, mientras que para la elongación fue de 20 a 90 s.

Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa horizontal al 1% en tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE) (Sambrook et al., 1989), con 40 µl de bromuro de etidio. Las condiciones de la electroforesis fueron de 100mV durante 1 h. Las bandas se visualizaron con un transiluminador de ultravioleta. Para poder determinar masa molecular del fragmento obtenido, se utilizó un marcador de 50-2000 pares de bases (Sigma Chemical Co., St Louis, MO).

1.5. Especificidad y sensibilidad de la PCR

La especificidad y sensibilidad del método se evaluaron después de su optimización. Para estos ensayos se fijaron las siguientes condiciones de PCR:

	Nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
	Desnaturalización inicial	94	3 min
35	Desnaturalización	94	20 s
	Hibridación	63	20 s
	Elongación	72	30 s
	Elongación final	72	5 min

El ensayo de especificidad se llevó a cabo con todos los aislados de *P. anguilliseptica*, así como la totalidad de las cepas bacterianas pertenecientes a distintas especies, tanto Gram-positivas como Gram-negativas incluidas en el estudio (Tabla 12).

Para el estudio de la sensibilidad, se utilizaron diluciones seriadas del DNA extraído de la cepa tipo de *P. anguilliseptica* CECT 899^T, que variaban desde 350 ng a 10 fg de DNA/tubo de reacción.

1.6. Aplicabilidad en tejidos

El ensayo de detección en tejidos se realizó con los siguientes órganos: riñón, bazo, cerebro y una mezcla de todos ellos. Se dividieron en porciones de 50 mg, a los que se les adicionaron 10 µl de diferentes diluciones (10^9 a 10 células/ml) de una suspensión del aislado de *P. anguilliseptica* AZ 197.1 en tampón fosfato salino (PBS; pH 7,4), homogenizándolo durante 30 s e incubando 1 h.

Para la extracción de DNA a partir de tejidos se empleó el kit comercial Dynabeads, siguiendo las instrucciones del fabricante (Fig. 19). El método se basa en la utilización de partículas magnéticas que capturan las moléculas de DNA. A la muestra inicial de tejidos se les añade 1 unidad (200 µl) de Dynabeads DNA direct[®] agitando por inversión hasta que se resuspenda completamente. Se incuba a temperatura ambiente durante 5 min. En este paso del proceso se produce la lisis de la muestra y la formación del complejo DNA/Dynabeads. A continuación se colocan las muestras en la plataforma magnética, se remueve el lisado con el imán y se le añade 200 µl del tampón de lavado. Se repite este paso usando el imán para eliminar inhibidores. Por último se resuspende el complejo DNA /Dynabeads en 20-40 µl de tampón.

Para la reacción de PCR se utilizaron los reactivos con las proporciones siguientes: 1 µl del cebador Psang 1 (2nM), 1 µl del cebador Psang 3 (2nM), 5 µl de la suspensión de DNA correspondiente y 18 µl de agua destilada estéril. Las condiciones en las que se realizaron las reacciones de PCR fueron las mismas que en el apartado anterior.

Por otro lado se obtuvieron tejidos de rodaballos inoculados experimentalmente con *P. anguilliseptica*. Grupos de 10 peces se inocularon intraperitonealmente con diferentes dosis (10^8 - 10^3 células/pez) de la cepa AZ 197.1 Los peces utilizados como control negativo se inocularon con 0,1 ml de PBS estéril. Los peces se mantuvieron en tanques de 50 l. de agua de mar a una temperatura de 15-17°C durante un periodo de tiempo de 21 días.

Los peces muertos se analizaron con el fin de reaislar la cepa inoculada. Los tejidos procedentes de estos peces (riñón, bazo, cerebro, así como una mezcla de ellos) se dividieron en fragmentos de 50 mg, se homogenizaron y se sometieron al tratamiento con el kit comercial Dynabeads para la extracción de DNA.

Los peces que sobrevivieron al finalizar el periodo de experimentación, fueron sacrificados y analizados bacteriológicamente, y sus tejidos se trataron de igual forma que los de los peces muertos durante el experimento. Todos los DNA obtenidos se utilizaron en los ensayos de PCR correspondientes.

1.7. Aplicabilidad del método a muestras naturales.

Se obtuvieron muestras de peces enfermos, con sospecha de infección por *P. anguilliseptica*, de piscifactorías de dorada, rodaballo y besugo durante la temporada de invierno 2002-2003. Dichas muestras se analizaron para presencia del patógeno por el método de PCR.

Además, el protocolo de PCR también se aplicó en el análisis de muestreos rutinarios de reproductores de dorada. Los órganos internos, incluyendo riñón, bazo y cerebro, se diseccionaron y se procesaron según el método especificado en los apartados anteriores.

En todos los casos, también se realizaron los métodos clásicos de cultivo, aislamiento e identificación bioquímica y serológica del patógeno.

Muestra inicial

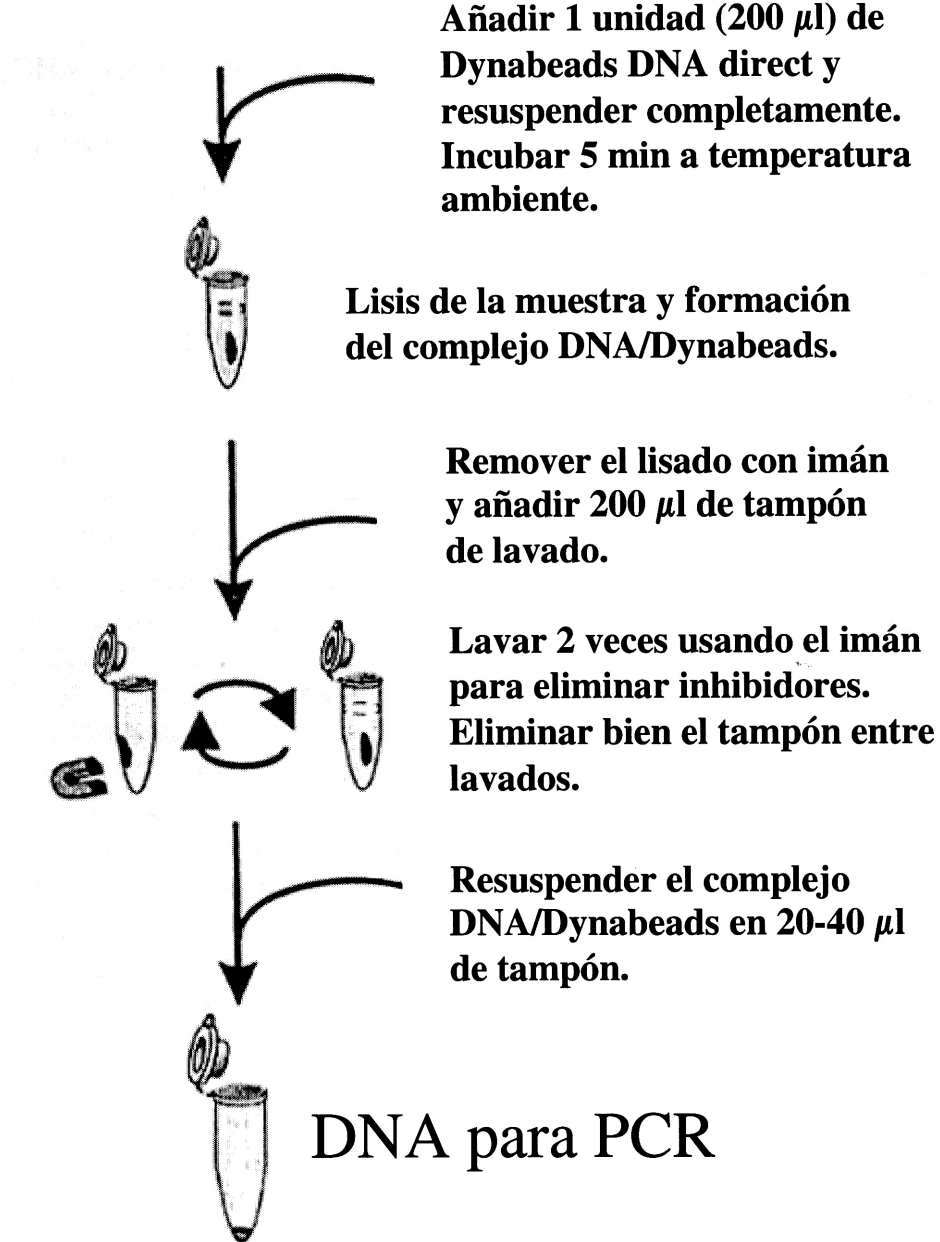


Fig. 19. Esquema del protocolo de utilización del kit Dynabeads para la extracción de DNA de tejidos.

2. PCR en tiempo real (rt-PCR)

2.1. Extracción de DNA

El DNA se obtuvo a partir de cultivos puros de aislados de *P. anguilliseptica*, mediante el sistema comercial InstaGene Matrix (Bio-Rad).

2.2. Optimización del método

Para los ensayos de optimización del protocolo de rt-PCR se utilizó el DNA de la cepa TW-P2 de *P. anguilliseptica*. La concentración inicial de la que se partió fue de 3,5 mg/ml, a partir de la cual se realizaron diluciones seriadas para construir la recta de regresión y determinar el coeficiente de correlación y la eficiencia de la reacción.

Las reacciones de amplificación se realizaron utilizando una preparación comercial, IQTM SYBR green supermix (Bio-Rad), que contiene todos los reactivos necesarios para la amplificación (100 mM KCl; 40 mM Tris-HCl, pH 8,4; 0,4 mM de cada uno de los dNTP; *Taq* polimerasa, 50 unidades/ml; 6 mM MgCl₂; Syber green I; 20mM fluorosceína), excepto el DNA y los cebadores.

Los cebadores utilizados fueron los mismos que para la PCR convencional: Psang 1 y Psang 3.

Las reacciones se prepararon en viales de 0,2 ml, para posteriormente cargarlas en una placa de 96 pocillos. A cada uno de ellos se le añadió:

	Volumen	Concentración final
Sybr green supermix	25 µl	1X
Psang 1	1 µl	500 mM
Psang 3	1 µl	500 mM
Agua destilada estéril	22 µl	
DNA	1 µl	

Volumen final : 50 µl

De cada una de las muestras se realizaron tres réplicas y se incluyó en todos los casos un control negativo.

Se consideró como reacción positiva la existencia de amplificación exponencial por encima del umbral (“threshold”), especificando el ciclo en que la curva de amplificación cruzaba ese umbral como el valor de “cycle threshold” (Ct). Estos valores Ct servirán, en su caso, para la cuantificación del DNA o las bacterias presentes en la muestra correspondiente.

2.3. Especificidad y sensibilidad.

Las condiciones de la rt-PCR utilizadas en estos ensayos fueron las mismas que para la PCR convencional, adaptándolas al nuevo termociclador del equipo, quedando del siguiente modo:

Fase	Nº de ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	1	95 °C	03:00
Amplificación	40	95 °C	00:20
		63 °C	01:00
Desnaturalización	1	95 °C	01:00
Renaturalización	1	55 °C	01:00
Cáculo Tm	80	55 °C	00:10

En la fase 5 la temperatura aumentó 0,5°C cada 2 ciclos, esta fase es necesaria para que se pueda construir la curva de fusión (“melting curve”), útil para determinar la presencia de productos de amplificación no específicos y dímeros de los cebadores.

El ensayo de especificidad se realizó con aislados de *P. anguilliseptica* y con cepas bacterianas pertenecientes a otras especies dentro del género *Pseudomonas*, así como con otros patógenos de peces, tanto Gram-positivos como Gram-negativos.

Detección de P. anguilliseptica por PCR

Para el estudio de sensibilidad, se utilizaron diluciones seriadas de la cepa TW-P2 de *P. anguilliseptica*, desde 3.5 µg/µl a 35 fg/µl.

2.4. Aplicabilidad a tejidos

Para la realización del ensayo de detección en tejidos, se utilizaron cerebros de peces sanos, de los que se tomaron muestras de 20 mg y se les adicionó 10 µl de diferentes diluciones seriadas (10^9 a 10 células/ml) de una suspensión del aislado de *P. anguilliseptica* CECT 899^T.

Para la extracción de DNA a partir de tejidos se utilizó el sistema comercial Dynabeads, ya descrito previamente en el apartado 1.5 de este capítulo.

Las condiciones de PCR utilizadas fueron las mismas que en el apartado anterior, utilizándose para la reacción las siguientes cantidades de reactivos: 1 µl del cebador Psang1, 1 µl del cebador Psang3, 5 µl de la suspensión de DNA correspondiente y 18 µl de supermix.

Al igual que en el caso de la PCR convencional se realizó un segundo ensayo de detección del patógeno en tejidos, de modo que se mimetizaran en lo posible las condiciones naturales. Para ello, se inocularon experimentalmente rodaballos de 5 g. con diferentes dosis (10^8 y 10^6 cél/pez) distintas cepas de *P. anguilliseptica*. Utilizando como control negativo peces inoculados con PBS. Los peces se mantuvieron en las mismas condiciones que en ensayos anteriores. Al finalizar el experimento se tomaron muestras de cerebro de todos los peces del mismo, tanto los muertos durante el proceso como los que fueron sacrificados. Todas ellas fueron procesadas de igual modo que en el caso anterior. En todos los casos se realizaron los métodos convencionales de cultivo, aislamiento e identificación bioquímica y serológica del microorganismo.

RESULTADOS

1. Optimización de la reacción PCR convencional

La optimización del protocolo de PCR con los cebadores Psang1/Psang3, se realizó empleando las cepas de *P. anguilliseptica* CECT 899^T, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *P. chlororaphis* CECT 4470^T. Se evaluó un rango de temperatura para el paso de hibridación (“annealing”) entre 52° y 68°C.

En estos ensayos se observó la amplificación del producto específico esperado de 418 pares de bases (bp) en la cepa tipo de *P. anguilliseptica* hasta 65°C de temperatura (Fig 20A). Por otro lado, se obtuvieron amplicones del mismo tamaño del aislado de *P. aeruginosa* en el rango de temperatura de 52° a 62°C, mientras que para el aislado de *P. chlororaphis* la banda de amplificación se producía entre 52° y 59°C (Fig.20B y C).

En función de estos resultados, y con el fin de poder discriminar entre estas especies próximas, se fijó la temperatura de hibridación a 63°C, evitando de este modo, la posible aparición de reacciones cruzadas.

La duración de los diferentes pasos del protocolo de la reacción PCR también se optimizó, ensayándose diferentes tiempos en un intervalo de 20 a 90 s. Con un protocolo de PCR de 35 ciclos se obtuvo una buena amplificación del producto específico utilizando tiempos entre 20 y 90 s para los pasos de desnaturalización e hibridación, y entre 30 y 90 s para el paso de extensión. Con el fin de conseguir un protocolo lo más rápido posible, se eligieron los menores tiempos que produjesen una buena amplificación.

En base a los resultados obtenidos se diseñó un protocolo de PCR, con una duración de 63 min, con las siguientes características:

	Desnaturalización inicial	94 °C	3 min
35 ciclos	Desnaturalización	94 °C	20 s
	Hibridación	63 °C	20 s
	Elongación	72 °C	30 s
	Elongación final	72°C	5 min

2. Especificidad de los cebadores y sensibilidad de la PCR

La especificidad de los cebadores Psang1 y Psang3 se evaluó utilizando DNA extraído de los cultivos puros de los 50 aislados de *P. anguilliseptica* incluidos en la Tabla 4, además de los 38 aislados de las otras especies de bacterias, tanto Gram-negativas como Gram-positivas, incluidas en la Tabla 12.

Utilizando las condiciones de amplificación especificadas, todos los aislados de *P. anguilliseptica*, independiente de su hospedador y origen geográfico, mostraron una banda fuerte y definida del tamaño esperado (418 bp) (Fig 21). En cambio, no se obtuvieron bandas de amplificación específica en ninguna de las otras especies bacterianas evaluadas (Fig. 22).

La sensibilidad de la técnica se evaluó utilizando diluciones seriadas de una suspensión de DNA, cuya concentración determinada por espectrometría (absorbancia a 260 nm), fue estimada en 3,5 µg/µl. El producto de amplificación de 418 pb se detectó para las concentraciones de DNA comprendidas entre 350 ng y 0,7 pg por tubo de PCR (Fig. 23A).

3. Aplicación a tejidos de pez

El estudio de aplicabilidad en tejidos de pez se realizó una vez optimizado el método. En estos ensayos se utilizó el DNA extraído de tejidos infectados “in vitro” con diferentes concentraciones de células de *P. anguilliseptica*. La amplificación fue positiva, tanto en los ensayos con distintos órganos (cerebro, riñón y bazo), como en los que se emplearon una mezcla de ellos. En este experimento se obtuvo un límite de sensibilidad de 5-10 bacterias por 50 mg de tejido (Fig. 23B).

Esta técnica se aplicó también a tejidos procedentes de peces infectados experimentalmente por inoculación intraperitoneal de concentraciones bacterianas en un rango de 10^8 a 10^3 células por pez. Esta infección experimental se realizó con el aislado de *P. anguilliseptica* AZ 197.1 para la que se había obtenido una dosis letal 50 (LD₅₀) de 1×10^6 bacterias/pez.

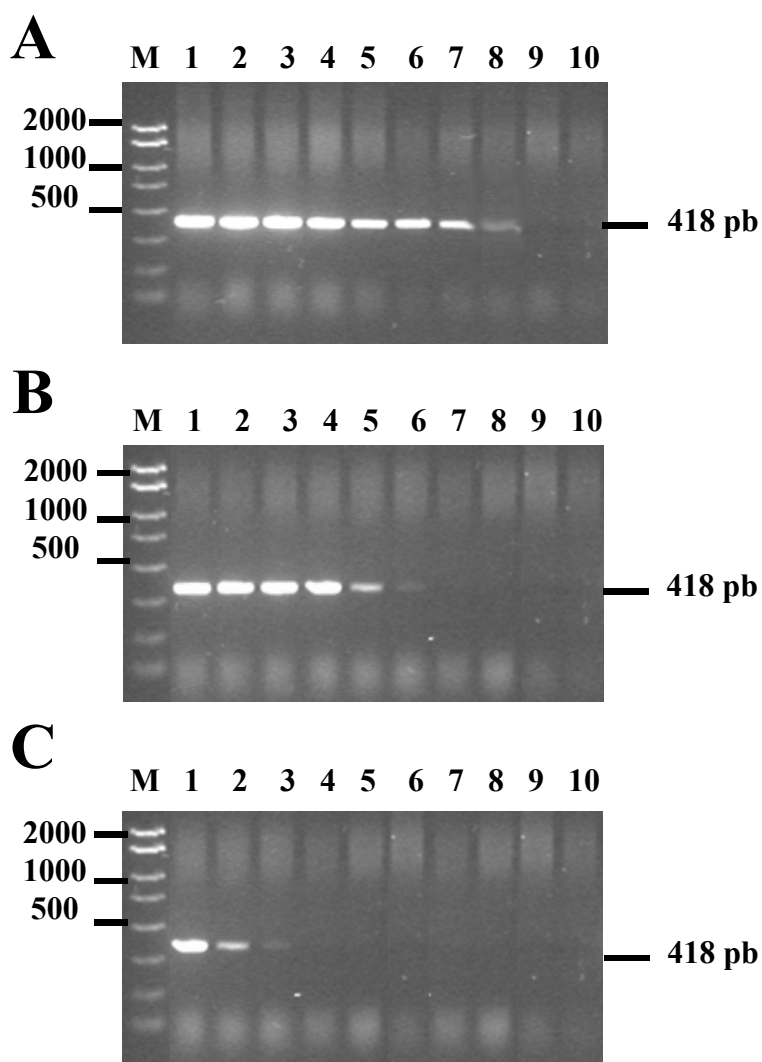


Fig. 20.- Optimización del protocolo de PCR. Ensayo de la temperatura de hibridación (“annealing”) de cebadores empleando las cepas de *P. anguilliseptica*(A), *P. aeruginosa* (B) y *P. cholororaphis* (C).

Líneas: M, marcador de peso molecular; 1^a 10, gradiente de temperatura: 57,2°; 57,9° 59°; 60,2°; 61,4°; 62,6°; 63,8°; 64,9°; 66° 66,7°C respectivamente. Los números indican tamaño en partes de bases del marcador (izquierda) y del fragmento específico (derecha).

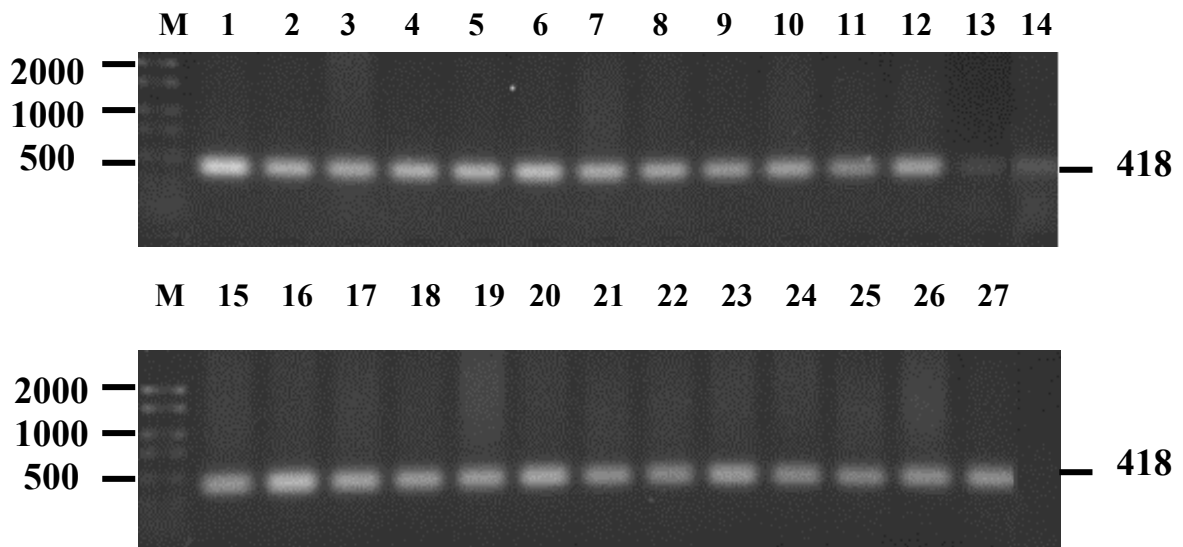


Fig. 21.- Especificidad del protocolo de PCR utilizando las condiciones optimizadas. Amplificación de ADN obtenido a partir de cultivos puros de *P. anguilliseptica*. Líneas: M; marcador de masa molecular; 1 a 6, aislados españoles de dorada: 99/50, TW-P1; TW-P2, TW-P7, C224; 35-L4; 7 a 13, aislados españoles de rodaballo: LD 4.3, RQ 171.1, RQ 175.1, AZ 197.1, RPM 733.1, AZ 209.1, AZ 211.1; 14 a 17, aislados daneses de anguila: 910215-1/1, 910315-1/6, 970129-2/2, 970129-2/3; 18 a 21, aislados finlandeses; W 12-91, P40B/91.P32/00,P19/00; 22 a 25, aislados franceses: JIP 14/91, JIP 24/91, LPAA 11705, LPAA 11066; 26, cepa de referencia CECT 899; 27, cepa de referencia CECT 901. Los números indican tamaño en pares de bases del marcador (izquierda) y del fragmento específico (derecha).

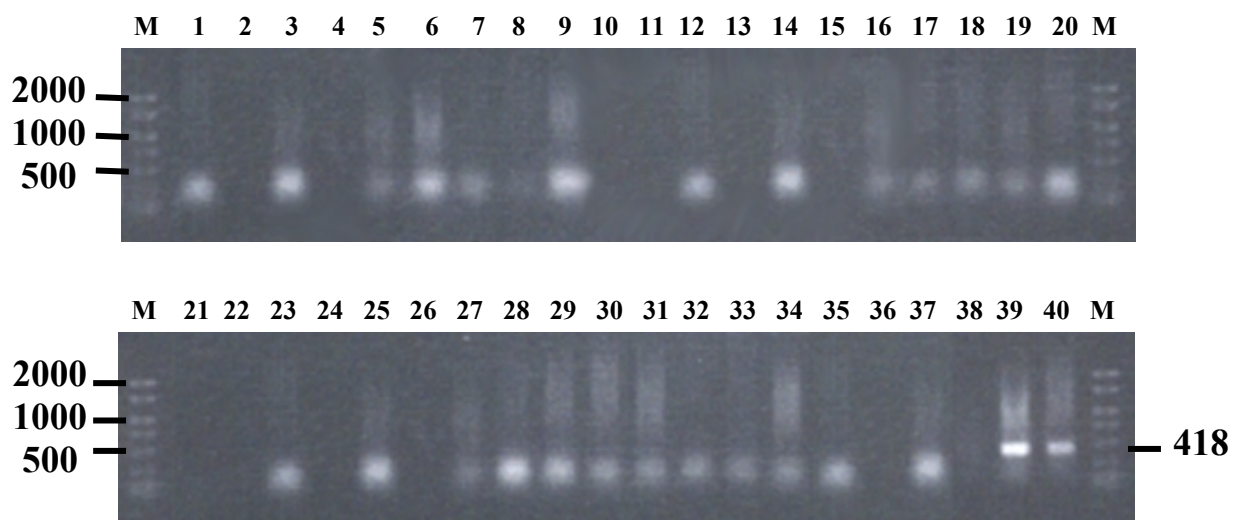


Fig. 22.- Especificidad del protocolo de PCR utilizando las condiciones optimizadas. Reacciones de PCR con otras especies bacterianas. Líneas: M, marcador de peso molecular; 1 a 38, especies relacionadas con *P. anguilliseptica* y patógenos de peces según el orden de la Tabla 5.1; 39, cepa de *P. anguilliseptica* CECT 899; 40, cepa de *P. anguilliseptica* TW-P1. Los números indican tamaño en pares de bases del marcador (izquierda) y del fragmento específico (derecha).

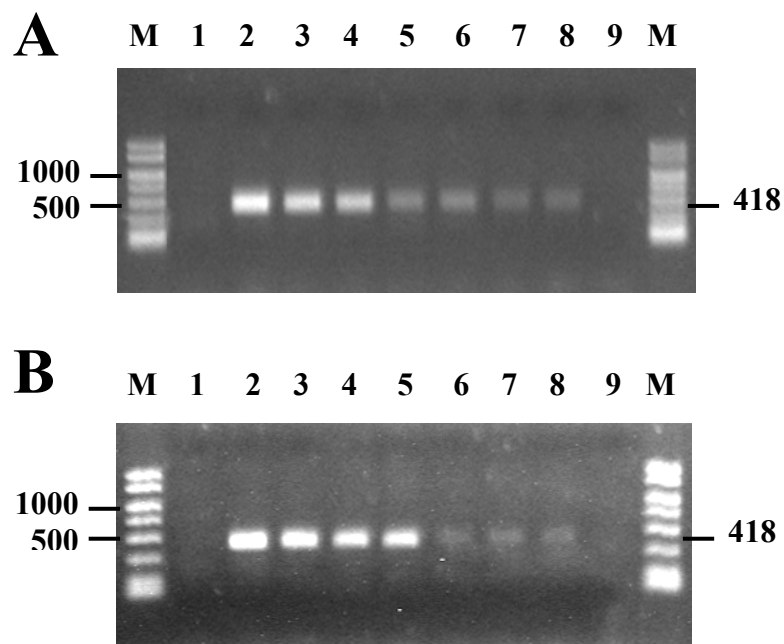


Fig. 23.- Sensibilidad del protocolo de PCR optimizado utilizando DNA obtenido de un cultivo puro de la cepa de referencia de *P.anguilliseptica* CECT 899^T (A) y DNA extraído a partir de de tejidos infectados con esa misma cepa.

Líneas en A: M, marcador de masa molecular; 1, control negativo (no DNA); 2 a 9, concentraciones de DNA de 350 ng, 35 ng, 350 pg, 35 pg, 3,5 pg, 700fg, 350 fg.

Líneas en B: M, marcador de masa molecular; 1, control negativo (no DNA); 2 a 9, DNA extraído de tejidos (50 mg) infectados con 10 µl de suspensiones bacterianas: 10⁹, 10⁸, 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10² células/ml respectivamente.

Los números indican tamaño en pares de bases del marcador (izquierda) y del fragmento específico (derecha).

El reaislamiento en placa de la bacteria, así como la banda específica de 418 bp se obtuvo en todos los tejidos procedentes de los peces que murieron en el periodo de 21 días post-infección (Fig 24). Sin embargo, en los peces supervivientes, infectados con dosis bacterianas inferiores a la LD₅₀, la detección del patógeno sólo fue posible por el método de PCR (Fig 24). Así, se observó la presencia de la banda de amplificación específica en todos los ensayos con tejidos de peces inoculados con dosis entre 10⁸ a 10⁴ células bacterianas/pez, mientras que en aquellos que recibieron una dosis de 10³ células/pez (equivalente a menor o igual 10 células bacterianas/mg de tejido), el microorganismo pudo ser detectado en el 60% de las muestras de tejidos ensayadas. No se observó amplificación en los tejidos de los peces inoculados con PBS que se emplearon como control negativo en el experimento de infección.

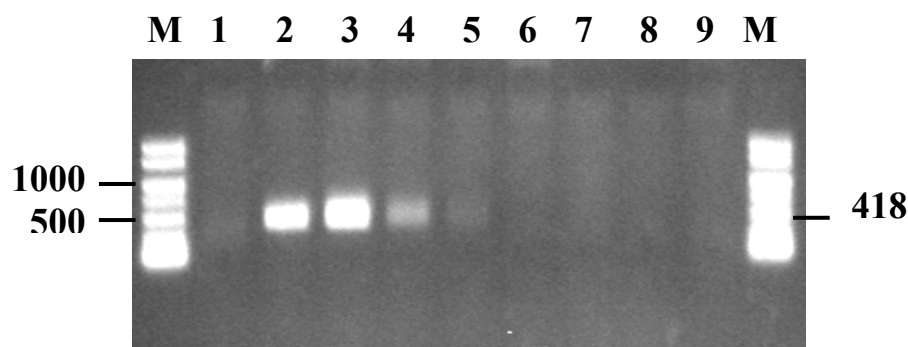


Fig. 24.- Aplicación de la PCR de *P. anguilliseptica* a tejidos obtenidos de peces infectados experimentalmente. Líneas: M, marcador de peso molecular; 1, control negativo (no DNA); 2 a 5, DNA extraído de tejidos correspondiente a peces infectados con 10⁸, 10⁶, 10⁶ y 10³ células bacterianas/pez; 6 a 9, DNA extraído de peces no infectados. Los números indican tamaño en pares de bases del marcador (izquierda) y del fragmento específico (derecha).

4. Aplicación del método a muestras naturales

Durante la temporada de invierno 2002-2003 se recibieron en el laboratorio muestras de peces obtenidos a partir de cuatro casos de mortalidad, dos en dorada, una en rodaballo y otra en besugo, que habían sido presuntamente diagnosticados como pseudomonadiasis. Se extrajo DNA de los órganos internos de los peces, incluyendo riñón, bazo y cerebro, que se utilizó en reacciones de amplificación empleando la técnica de PCR desarrollada en este trabajo. *P. anguilliseptica* pudo ser detectada en todos los casos, confirmándose el diagnóstico. (Fig. 25).

Además, la técnica se aplicó también a DNA obtenido a partir de tejidos correspondientes a un análisis rutinario de reproductores de dorada, obteniéndose, en este caso, amplificación específica en el 40% de los casos (4 positivos de 10 peces analizados) (Fig. 25). Es interesante destacar el hecho, de que sólo se obtuvo amplificación cuando se utilizó el DNA extraído de cerebro.

El patógeno también pudo ser detectado por técnicas clásicas, que incluyeron el aislamiento en medios de cultivo y la identificación por técnicas bioquímicas y serológicas, a partir de los peces procedentes de casos de mortalidad pero no en los peces pertenecientes al muestreo rutinario.

5. Optimización del método de rt-PCR .

La optimización del protocolo de rt-PCR se realizó a partir del DNA extraído de la cepa TW-P2, aislada de dorada. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo con tres réplicas de cuatro diluciones seriadas de concentraciones conocidas (de 3.5 µg a 35 fg) para la construcción de la recta de regresión (Fig 26). Este ensayo se realizó por triplicado.

Con la intención de descartar la posible formación de dímeros u otros productos de amplificación inespecíficos se realizó el estudio de la curva de fusión de los productos de la reacción (Fig. 27), comprobándose que bajo estas condiciones sólo se genera un producto de amplificación específico.

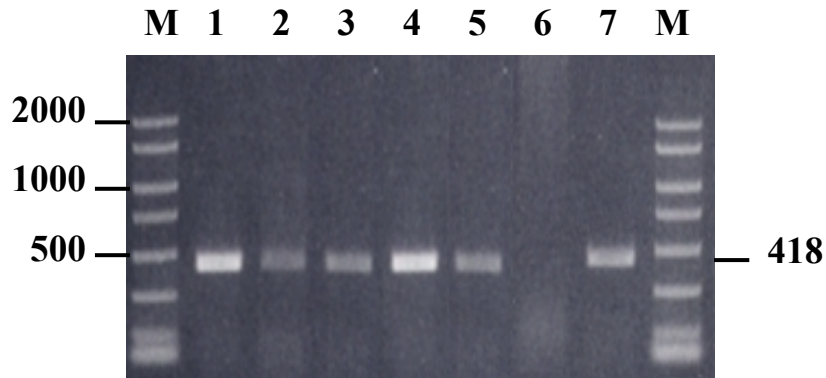


Fig. 25.- Aplicación de la PCR de *P. anguilliseptica* a tejidos de pez obtenidos de muestras naturales. Líneas: M, marcador de masa molecular; 1, dorada de la piscifactoría A (cerebro); 2, dorada de la piscifactoría B (bazo); 3, rodaballo de la piscifactoría C (riñón); 4, besugo de la piscifactoría D (cerebro) 5, reproductor de dorada de la piscifactoría E (cerebro); 6, control negativo (no DNA); 7, control positivo (DNA de la cepa de *P. anguilliseptica* CECT 899). Los números indican el tamaño en pares de bases del marcador (izquierda) y del fragmento específico (derecha).

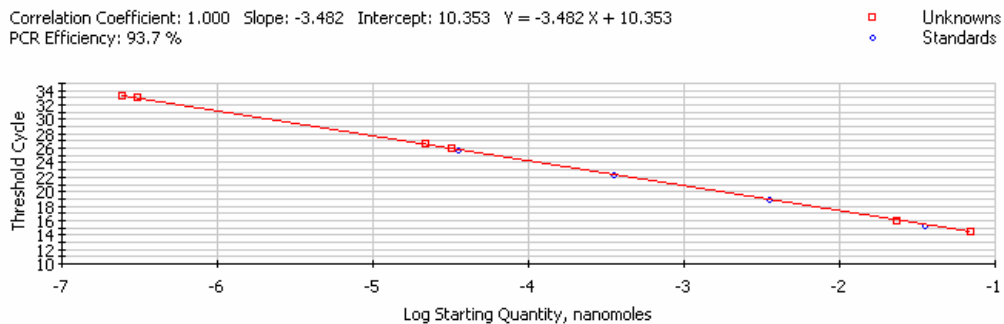


Fig. 26.- Recta de regresión obtenida en el ensayo de optimización de rt-PCR, al enfrentar los valores Ct de las muestras estándar con sus correspondientes concentraciones de DNA , mostrando un coeficiente de correlación de 1 y una eficiencia del 93,7%.

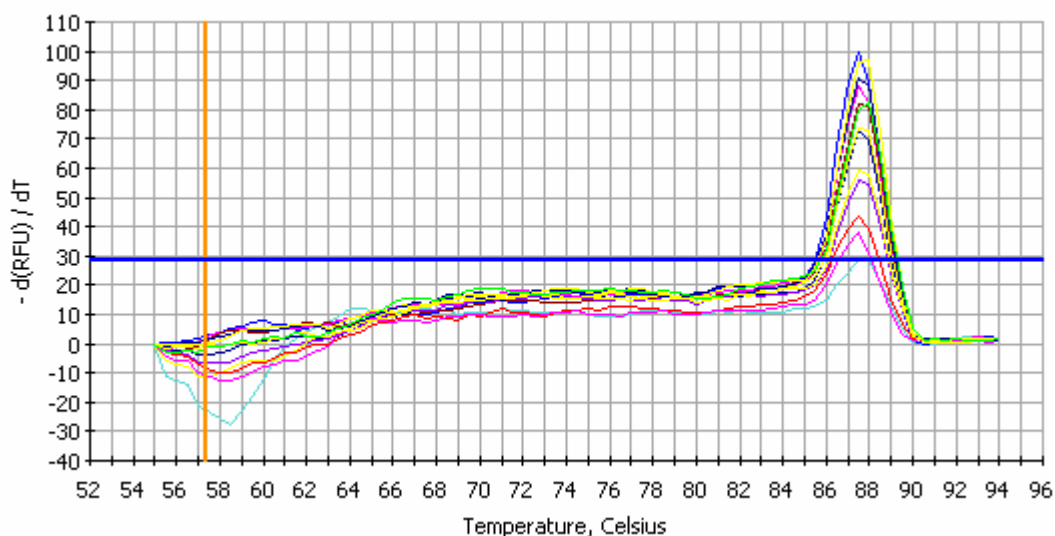


Fig. 27.- Curva de fusión de la reacción de rt-PCR. La aparición de un solo pico de fluorescencia indica la presencia de un único producto de amplificación específico.

6. Especificidad y sensibilidad del método.

El ensayo de especificidad para la técnica de rt-PCR se realizó con los aislados de *P. anguilliseptica*, incluyendo además aislados de otros patógenos de peces y de otras especies del género *Pseudomonas*. Los resultados obtenidos mostraron la presencia de amplificaciones positivas sólo en los aislados de *P. anguilliseptica* (Fig. 28).

La sensibilidad de la técnica se evaluó empleando diluciones seriadas de la suspensión de DNA, cuya concentración ya se había calculado espectrofotométricamente (a 260 nm) con anterioridad para la técnica de PCR convencional (apartado 2 de este capítulo). Los resultados mostraron la existencia de amplificación exponencial por encima del umbral (“treshold”) para concentraciones de DNA entre 3,5 μ g y 35 fg, observándose valores de Ct entre 17,9 y 39 (Fig. 29).

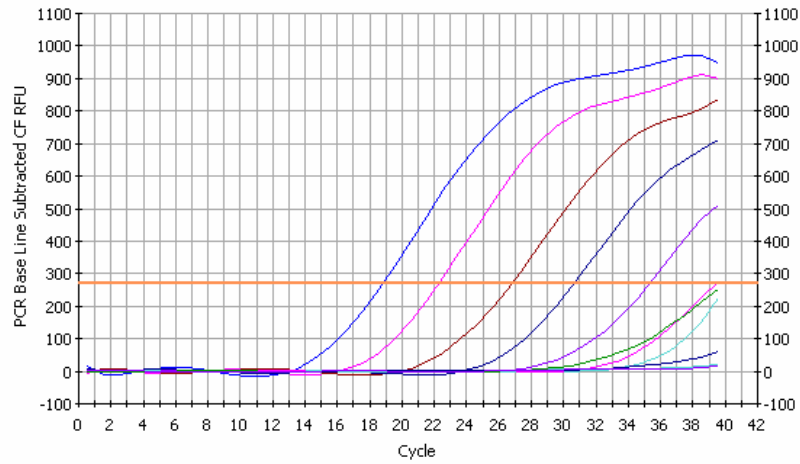


Fig. 28.- Gráfica de amplificación resultado del ensayo de especificidad utilizando DNA obtenido de las cepas representativas de *P. putida* CECT 324 (—), *P. chlororaphis* CECT 4470 (—), *Pseudomonas* sp. RM 98.2 (—), *Ph. damsela* subsp. *piscicida* DI 2.1 (—), *A. salmonicida* RPS 71 (—) y *L. garvieae* TW 446.B3 (—). Se observa que ninguna de las amplificaciones sobrepasa el umbral de detección.

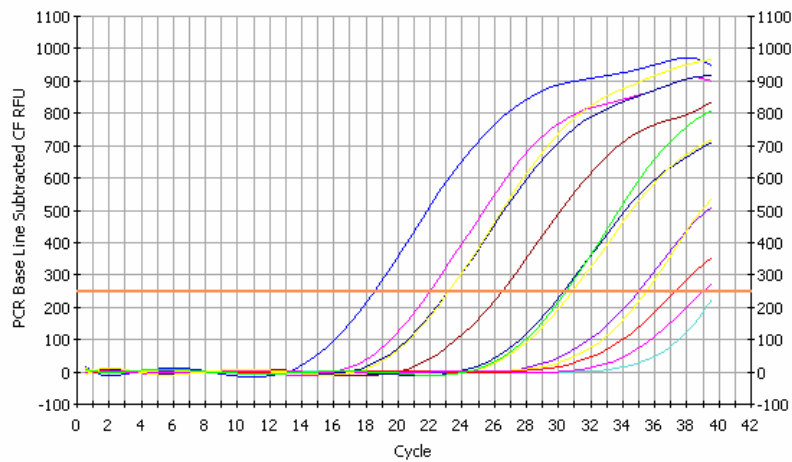


Fig. 29.- Gráfica de amplificación resultado del ensayo de sensibilidad utilizando diluciones seriadas del DNA obtenido de la cepa de *P. anguilliseptica* TW-P2, con concentraciones entre 3.5 µg (—) y 3.5 fg (—).

7. Aplicación a tejidos de pez.

La técnica optimizada se evaluó para su aplicabilidad potencial a tejidos de pez. Se realizaron una serie de estudios preliminares para descartar la posible inhibición de la reacción de rt-PCR. Con este fin, se utilizaron tejidos sanos los cuales se infectaron “in vitro” con diluciones seriadas de una suspensión bacteriana de *P. anguilliseptica*, comprobando que la extracción de DNA por Dynabeads y la técnica de rt-PCR era aplicable para la detección directa de este patógeno en tejidos de pez. En este ensayo se obtuvo un límite de detección de 1 bacteria/ 20 mg de tejido, obteniéndose en este caso un Ct de 35,7 (Fig. 30).

Esta parte del trabajo se completó con la realización de extracciones de DNA a partir de tejidos de peces infectados experimentalmente por vía intraperitoneal. Los resultados indicaron reacciones de amplificación positiva tanto con el DNA de los peces muertos durante el experimento como con el de los supervivientes que se sacrificaron al término de éste con valores de Ct entre 16 y 33,4 (Fig. 31).

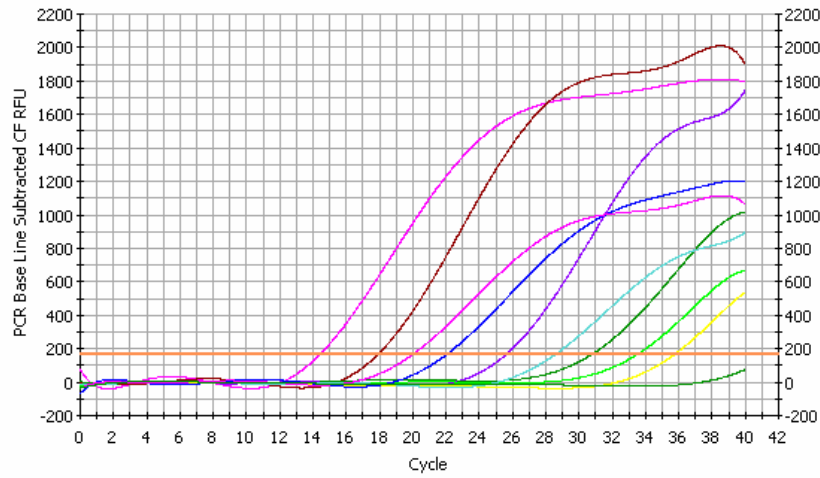


Fig. 30.- Amplificación por rt-PCR de DNA extraído a partir de tejidos infectados “in vitro” con suspensiones bacterianas de *P. anguilliseptica* (entre 10^8 [—] y 10^2 [—] células/ml). (—, — y —), controles positivos (diluciones de DNA de concentración conocida); (—), control negativo.

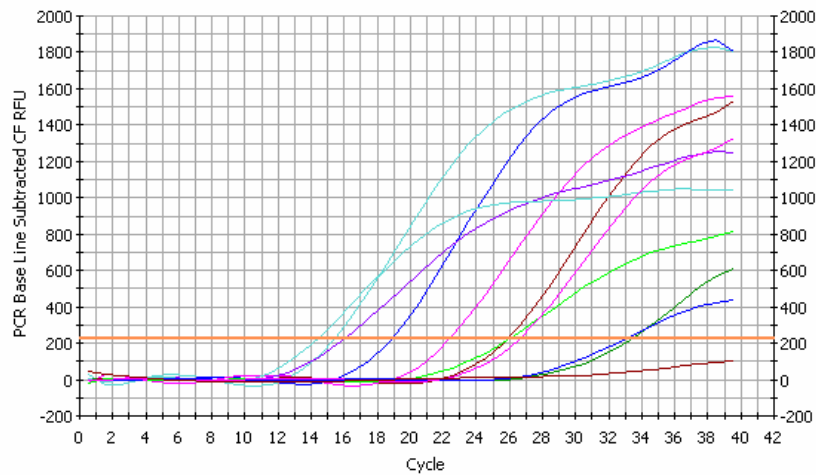


Fig. 31.- Amplificación por rt-PCR de DNA extraído a partir de tejidos obtenidos de peces infectados experimentalmente con cuatro cepas de *P. anguilliseptica* (10^8 y 10^6 células/ml) con distinto origen y hospedador. (—, —, — y —), controles positivos (diluciones de DNA de concentración conocida); (—), control negativo.

V. PATOGENICIDAD Y FACTORES DE VIRULENCIA

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Cepas bacterianas. Ensayos de virulencia y especificidad de hospedador

Para el estudio de los factores de virulencia, tanto celular como extracelular, se seleccionó un grupo de cepas de *P. anguilliseptica* en función de su hospedador y sus características serológicas y genéticas. La virulencia de los aislados de *P. anguilliseptica* para peces se determinó “in vivo” con alevines de rodaballo (5 g), mantenidos en tanques de agua de mar sometida a filtración en circuito cerrado a 12°C con aireación, siguiendo la metodología descrita por Toranzo et al. (1983b). Los inóculos se prepararon a partir de cultivos frescos en placa, resuspendiendo las bacterias en tampón PBS estéril (pH 7,4) a una concentración inicial de 10^9 células/ml por comparación de su turbidez con la de los tubos de la escala McFarland. El número de bacterias viables y cultivables (dosis real) presentes en el inóculo se determinó por siembra directa en placas de TSA (Difco) de 0,1 ml de diluciones decimales de la suspensión inicial. Los peces se inocularon intraperitonealmente con 0,1 ml de las distintas suspensiones bacterianas (de 10^3 a 10^8 bacterias/ml), empleando 10 peces por dosis. Como control se utilizó el mismo número de peces inoculados con PBS estéril. Las mortalidades ocurridas durante el periodo de experimentación (21 días), sólo se consideraron causadas por las cepas inoculadas si éstas se recuperaban en cultivo puro a partir de los órganos internos de los peces moribundos o recién muertos. El grado de virulencia, expresado como dosis letal 50% (LD_{50}), se determinó mediante el método de Reed & Muench (1938).

Las cepas se distribuyeron en tres categorías de virulencia (Santos et al., 1991):

Cepas altamente virulentas	$LD_{50} = 10^2$ a 10^5 bacterias/ml
Cepas moderadamente virulentas	$LD_{50} = 10^6$ a 10^7 bacterias/ml
Cepas avirulentas	$LD_{50} > 10^8$ bacterias/ml

2. Características asociadas a la superficie celular

2.1. Detección del material capsular

Para la detección de la presencia de estructuras capsulares se utilizó el siguiente procedimiento:

Los aislados seleccionados se incubaron en AS durante 48 h a 25°C y se resuspendieron en 1 ml de PBS al que se le añadió una solución fijadora (lisina, 100mM; glutaraldehído, 2,5%). Después de 20 min a temperatura ambiente, se depositaron en portaobjetos dejándolas secar al aire, se cubrieron con fucsina básica (3 min) y se decoloraron con agua destilada. Cuando las preparaciones estuvieron secas, se observaron al microscopio óptico (objetivo de inmersión 100X).

2.2. Ensayos de hidrofobicidad. Adherencia bacteriana a hidrocarburos.

El carácter hidrofóbico de la superficie celular de las cepas de *P. anguilliseptica* se evaluó según el sistema de partición de fases de Rosenberg & Doyle (1990), empleando como la fase acuosa PBS y como fase no acuosa dos hidrocarburos líquidos, octano y hexadecano (Sigma). Los aislados se cultivaron en el medio AS durante 48h a 22-24°C, se lavaron por centrifugación y se resuspendieron en PBS hasta una absorbancia de 0,6 a 600nm (A_{600}), que equivale aproximadamente a 10^6 bacterias/ml. Tomándose a continuación 2 ml de cada una de las suspensiones bacterianas, para repartirlas en dos tubos Ependorf, a los que se les añadió 150 μ l de octano o hexano respectivamente. Se agitaron uniformemente durante 1 min y se dejaron reposar durante 15 min a temperatura ambiente. Por último, y tras haberse producido la separación de fases, se determinó la absorbancia a 600 nm de la fase acuosa inferior.

El valor de adherencia a los hidrocarburos se determinó mediante la ecuación:

$$\frac{A_{600} \text{ de la solución bacteriana original} - A_{600} \text{ de la fase acuosa}}{A_{600} \text{ de la solución bacteriana original}} \times 100$$

considerándose un porcentaje menor del 20% como hidrofobicidad negativa, del 20 al 50% moderadamente hidrofóbico y mayor del 50% altamente hidrofóbico (Rosenberg & Doyle, 1990).

2.3. Estudio de la actividad hemaglutinante

La capacidad de los aislados para aglutinar eritrocitos de trucha arcoiris y rodaballo se evaluó según la metodología de Toranzo et al. (1983c) y Santos et al. (1987).

La sangre se obtuvo en condiciones asépticas, mediante punción de la vena caudal de los peces elegidos, rodaballo y trucha. Las muestras de sangre se recogieron en solución Alsever en proporción 1:1 (Allan & Stevenson, 1981) y se mantuvieron a 4°C hasta su utilización dentro de las 48 h siguientes. Antes de su uso, los eritrocitos se lavaron tres veces en PBS por centrifugación a 3000 rpm durante 3 min y se resuspendieron en el mismo tampón a una concentración final del 3% (v/v).

Las suspensiones bacterianas se prepararon en tampón PBS a partir de cultivos puros crecidos en medio sólido (AS), ajustándolos a una concentración de 10^9 células/ml (tubo número 4 de turbidez según la escala McFarland).

Los ensayos de aglutinación se realizaron en portaobjetos múltiples, mezclando 20 µl de la suspensión bacteriana con la misma cantidad de suspensión de eritrocitos. Se incluyeron tanto controles positivos como negativos. Como control positivo se utilizó una cepa de *Vibrio anguillarum* R-82 y como controles negativos se utilizaron las mezclas de eritrocitos-PBS y bacterias-PBS. La aparición de hemaglutinación en un intervalo menor de 10 min, indicó la presencia de cepas positivas para ese carácter.

2.4. Ensayos de inhibición de la actividad hemaglutinante

Con las cepas que resultaron positivas para la actividad hemaglutinante, se llevaron a cabo estudios para su inhibición. Para esto se realizaron tres tipos de tratamientos, enzimático (proteínasa K), con azúcares (L-fucosa), y por calor.

- i) El tratamiento enzimático se realizó por adición de 100 μ l de una solución de proteínasa K (10 mg/ml; Sigma) en PBS a 900 μ l de las suspensiones bacterianas. La mezcla se incubó durante una hora, realizándose a continuación dos lavados con PBS por centrifugación y la resuspensión de las células bacterianas en el volumen inicial de PBS.
- ii) El tratamiento de inhibición mediante azúcares, se realizó mediante la aplicación de soluciones al 1% de L-fucosa (Merck).
- iii) El tratamiento con calor se llevó a cabo sometiendo las suspensiones bacterianas a una temperatura de 80°C durante 15 min.

Los experimentos se desarrollaron en portaobjetos múltiples. En los casos de tratamiento enzimático y por calor, mezclando 20 μ l de cada suspensión tratada con 20 μ l de la suspensión eritrocitaria, y en el caso del tratamiento con azúcares, mezclando la suspensión bacteriana con 20 μ l de la solución de azúcar, y añadiendo 20 μ l de la suspensión de eritrocitos después de 20 s (Magariños, 1995).

En todos los ensayos de inhibición la observación de los resultados se realizó por observación directa de la aglutinación en el portaobjetos y al microscopio óptico (400X).

3. Adherencia e invasividad

3.1. Ensayos de adherencia

La capacidad de adherencia se determinó mediante un ensayo “in vitro”, siguiendo la metodología descrita por Robins-Browne et al. (1994). Se utilizaron tres líneas celulares de peces de distinto origen: TV1 (células de rodaballo), SAF-1 (células de dorada) y CHSE-214 (células de salmón).

Las células eucarióticas se mantuvieron de forma rutinaria en frascos de cultivo de 25 cm² de superficie plana (Nunc) utilizando como medio de crecimiento el Medio L-15 suplementado con: suero fetal de ternera (SFT) al 10% (v/v) (Flow), penicilina (100U/ml), estreptomocina (100 µg/ml) (Flow) y glutamina (2%) (Flow). Para el mantenimiento celular se utilizó el mismo medio pero con una concentración de SFT del 2%. Las células eucarióticas se cultivaron como monocapas semiconfluentes en placas de 24 pocillos de fondo plano (Nunc). La temperatura de crecimiento osciló entre 20 y 25°C, dependiendo del tipo de línea celular.

Dos horas antes de realizar el ensayo, se retiró el medio y se reemplazó por medio fresco sin antibióticos, para evitar la muerte de las bacterias que van a ser inoculadas. Posteriormente, se eliminó el medio, se lavaron las células tres veces con PBS estéril con ayuda de un agitador orbital.

Las suspensiones bacterianas se obtuvieron resuspendiendo en PBS los cultivos bacterianos crecidos en TSA-1 y AS a 22-24°C durante 48 h hasta lograr una concentración de 10⁸ células/ml. El número de bacterias viables inoculadas se determinó por siembra directa de diluciones decimales de la suspensión original en placas de TSA-1.

Los ensayos se realizaron mediante la inoculación de 0,1 ml de las suspensiones bacterianas en los tapices celulares. Las placas se incubaron durante 1 h, transcurrido este tiempo, se elimina el inóculo bacteriano mediante el lavado de las monocapas con PBS

Factores de Virulencia

estéril, sometiéndolas a una ligera agitación (200 rpm) en un agitador orbital con el fin de eliminar así las células bacterianas que no se encontrasen fuertemente adheridas. El siguiente paso fue lisar las monocapas celulares con Triton X-100, diluido al 1% en agua estéril, durante 5 min. Este paso se realizó con la ayuda de una punta de pipeta para disgregar el tapiz. Se tomó 1 ml de cada pocillo y se realizaron diluciones seriadas, sembrándose en una placa de TSA-1, determinándose así el porcentaje de adherencia de cada uno de los aislados. Como control positivo se incluyó una cepa de *Yersinia ruckeri* (11.4) y como control negativo un aislado de *Vibrio anguillarum* (R-82)(Romalde et al., 1990; Toranzo et al., 1987b).

Una cepa se consideró adherente cuando su índice de adherencia fue mayor de 10, con adherencia media si el índice estaba comprendido entre 1-10, y no adherente si el índice fue menor que 1 (Robin-Brown et al., 1994).

3.2. Capacidad invasiva

Para la realización del ensayo de invasividad se utilizaron las mismas líneas celulares empleadas en el ensayo de adherencia, siguiendo los procedimientos de Konkel & Joens (1989).

Las suspensiones bacterianas se prepararon del mismo modo que para los ensayos de adherencia. El número de bacterias viables presentes en el inóculo se determinó por siembra directa de TSA de diluciones decimales de la suspensión inicial.

Dos horas antes de inocular en cada pocillo 0,1 ml de la suspensión bacteriana correspondiente se les retiró a las células el medio de cultivo, sustituyéndolo por medio fresco sin antibiótico. Después de la inoculación, se incubó durante 1h a 20-25°C, para permitir la adherencia e invasividad de los aislados.

Transcurrido ese tiempo de incubación, las células se lavaron con PBS estéril para eliminar las bacterias que no se habían adherido y se añadió medio con gentamicina (50 µg/ml) que actuará sobre las bacterias extracelulares eliminando así las bacterias que pudieron haber quedado adheridas a las células pero que no penetraron en éstas. Se incubó durante 2 h con gentamicina a 20-25°C. Se lavaron, de nuevo, los tapices con PBS estéril y

se le añadió 1 ml de la solución Triton X-100 al 1% (v/v). Se dejó actuar 5 min para lisar las células. Las suspensiones obtenidas se diluyen en PBS para determinar el número de bacterias intracelulares por siembra en TSA-1. Se utilizaron los mismos controles que en el ensayo de adherencia.

Para realizar el cálculo del número medio de bacterias intracelulares por número de células del tapiz, se utilizó el índice de Lawson et al. (1985):

Invasividad= (Número de bacterias inoculadas/Número de células por pocillo) x 100

Según estos autores una cepa se consideró altamente invasiva cuando su índice de invasividad fue mayor de 10, con una invasividad media si el resultado de la ecuación se situó entre 1 y 10, y no invasivas si el índice fue menor de 1.

Así mismo, se utilizó el criterio de Janda et al. (1991), según este criterio una cepa se consideró invasiva si el número de bacterias intracelulares por pocillo obtenidas en el recuento en palca era mayor de 10^3 bacterias.

4. Estudio de los factores de virulencia extracelulares.

4.1. Obtención de productos extracelulares

Para la obtención de los productos extracelulares (ECP) se emplearon los siguientes procedimientos:

- a) En cultivo líquido.

Las cepas bacterianas se cultivaron a 22-24°C con agitación (200 rpm) en matraces Enlarmeyer de 250 ml conteniendo 100 ml de caldo tripticasa soja suplementado con 1% de NaCl (TSC-1). Los matraces se inocularon con 0,2 ml de cultivos frescos de los diferentes cepas y se incubaron durante 48 h. Después de la incubación se eliminaron las células bacterianas por centrifugación a 10.000 x g durante 30 min. Los sobrenadantes así

Factores de Virulencia

obtenidos se esterilizaron por filtración a través de membranas con un tamaño de poro de 0.45 μm (Millipore).

b) En medio sólido

La obtención de los ECP a partir de medio sólido se efectuó siguiendo la técnica de Liu (1957). Sobre placas de 24 x 24 cm (Nunc) conteniendo los medio TSA-1 o AS, se depositaron membranas de celofán estériles, sembrando a continuación 3 ml de cultivos frescos de las distintas cepas empleando hisopos estériles. Después de un periodo de 48 h a 22-24°C, se recogieron las células bacterianas por lavado del celofán con PBS estéril. Las suspensiones resultantes se centrifugaron a 10.000 x g durante 30 min a 4°C, y los sobrenadantes resultantes se esterilizaron por filtración.

Todos los extractos se distribuyeron en alícuotas de 2-3 ml y se mantuvieron congelados a -20°C hasta el momento de su utilización.

Con objeto de obtener una mayor concentración de productos extracelulares, se liofilizaron parte de los ECP obtenidos por los métodos de los apartados anteriores, concentrando las muestras 5 veces. Los procedimientos que se describen a continuación se realizaron tanto con los ECP normales como con los concentrados.

4.2. Caracterización de las actividades enzimáticas de los ECP “in vitro”

i) Las actividades enzimáticas generales de los ECP se evaluaron siguiendo el sistema API-ZYM (bioMerieux), empleado anteriormente para determinar dichas actividades en células vivas. Las galerías se inocularon con 60 μl /celdilla de cada ECP y se incubaron 24 h a 24°C. Transcurrido este periodo se adicionaron los reactivos reveladores y se anotaron los resultados siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

ii) Detección de proteasas. La actividad proteolítica global presente en las muestras de ECP, se determinó mediante el empleo de un método colorimétrico, utilizando el sistema multiprotéico Azocoll (Sigma), según las instrucciones de la casa comercial. A 100 µl de muestra se añadieron 2,4 ml de una solución de Azocoll (8,4 mg/ml) en tampón Tris-HCl (pH 7,2). La mezcla se incubó a 37°C (en baño) durante 30 min, y a continuación se añadieron 2,5 ml de una solución acuosa de ácido tricloroacético (10% p/v) para detener la reacción. Esta mezcla final se centrifugó 15 min. a 2.000 rpm y se determinó la absorbancia del sobrenadante a 520 nm. El diluyente de la mezcla, procesado de la misma forma, se utilizó como blanco. La unidad de actividad proteolítica equivale a una absorbancia de 1,0 a 520 nm.

Las actividades caseinasa, gelatinasa y elastasa se evaluaron por el método de difusión radial en placa utilizando como inóculo 10 µl de cada ECP, siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.1 del capítulo III.

iii) Hidrólisis de almidón y esculina. La detección de amilasas se llevó a cabo sobre placas de TSA-1 suplementado con almidón al 0,4%. Se depositaron 10 µl de cada ECP sobre la superficie del medio, incubando las placas a 25°C durante 48 h. Las placas se revelaron con lugol, de igual forma que en las células vivas.

La hidrólisis de esculina se determinó sobre placas de TSA-1 suplementadas con 0,1% de esculina (Merk). Las muestras positivas producen un halo de ennegrecimiento a las 72 h.

iv) Actividades lipolíticas. Se determinaron por el método de difusión radial en placa, evaluándose las mismas que en las células vivas. (Capítulo III, apartado 2.1).

v) Actividad hemolítica. La actividad hemolítica se evaluó utilizando placas de AS tal y como se explicitó en el Capítulo III (apartado 2.1) de esta memoria.

4.3.- Cálculo de los niveles de proteínas y lipopolisacáridos en los productos extracelulares

El contenido en proteínas de los productos extracelulares se determinó según el método de Bradford (1976).

Para la elaboración de la recta patrón se utilizaron concentraciones crecientes (5-100 µg/ml) de seroalbúmina bovina (Sigma). A cada 100 µl de cada concentración de seroalbúmina, así como de las muestras a estudiar y del control (agua destilada) se añadieron 5 ml de reactivo Bradford (BIO-Rad). Una vez homogenizadas las muestras (2 min-1 hora) se determinó la concentración por absorbancia a 595 nm. La concentración de proteínas se determinó por extrapolación en la recta patrón.

Los niveles de lipopolisacáridos (LPS) se calcularon siguiendo la técnica descrita por Keler & Novotny (1986) usando LPS extraídos de *E. coli* 0128:B12 (Sigma) para la elaboración de la recta de calibrado. El ensayo se realizó añadiendo 2 ml de reactivo DMB (1,9 dimetilmelano, 0,016g; glicina, 4,28g; NaCl, 3,33g; NaOH, 47ml; etanol 80%, 5 ml; pH 10) a 100 µl de las muestras de ECP o soluciones patrón y leyendo la absorbancia de las mezclas a 535 nm (A_{535}). Como blanco se utilizó agua destilada.

4.4. Análisis en geles de poliacrilamida-SDS y mediante “Western-blot”.

Se empleó la misma metodología descrita en el capítulo III, apartado 5.3 para el análisis de proteínas de membrana y lipopolisacáridos. Las muestras de ECP (15 µl) se mezclaron en proporción 1:1 con tampón FSB 2X y se hirvieron 5 min. Los geles se tiñeron con azul Coomassie, en el caso de las proteínas y con nitrato de plata para los LPS.

Para la realización de la transferencia electroforética y del ensayo de western-blot tanto de proteínas como de LPS se utilizaron los mismos métodos que en el capítulo III, apartado 5.4. Los sueros utilizados fueron los obtenidos frente a las cepas de *P. anguilliseptica* CECT 899^T y TW-P1.

4.5. Citotoxicidad

Para la realización del ensayo de citotoxicidad se utilizaron las líneas celulares TV1, SAF-1 y CHSE-214.

La metodología empleada es la descrita por Toranzo et al. (1983c). Las células eucariotas se cultivaron en placas de 48 pocillos hasta lograr monocapas confluentes, siendo la temperatura de incubación de 20-25°C, dependiendo de la línea celular. Antes de la realización del ensayo se retiró el medio de los pocillos y se reemplazó por medio fresco (0,9 ml/pocillo). A continuación las monocapas se incubaron con 0,1 ml de las muestras de ECP y ECP liofilizados. Como controles negativos se utilizaron PBS y el medio TSC-1 sin inocular. Se efectuaron observaciones periódicas durante 72 h, considerándose un efecto citotóxico positivo la alteración total o parcial de las monocapas celulares, estableciéndose tres grados de positividad: (+) aparición de síntomas claros de daños celulares, tales como vacualización, prolongaciones dendríticas, acúmulos celulares, etc.; +, destrucción parcial del tapiz celular; y ++, destrucción total del mismo con desprendimiento de las células del fondo del pocillo.

4.6. Toxicidad de los productos celulares “in vivo”

La toxicidad de los ECP in vivo se evaluó por inoculación en rodaballos (5 g) mediante inyección intraperitoneal de 0.1 ml de las diferentes muestras de ECP, tanto normales como liofilizados. Las condiciones de los experimentos de inoculación se han descrito anteriormente en el apartado de ensayos con células vivas. Como control negativo se utilizó un lote de peces inoculados con la misma cantidad de PBS estéril.

RESULTADOS

1.-Estudio del grado de virulencia

Para determinar el grado de virulencia de los aislados de *P. anguilliseptica* se realizó un ensayo con alevines de rodaballo a los que se les inoculó con diferentes concentraciones de cepas de este patógeno. De acuerdo a la clasificación en grados de virulencia descrita previamente, las mayoría de las cepas ensayadas independientemente de su origen geográfico u hospedador, resultaron moderadamente virulentas con LD₅₀ en el rango de 10⁶-10⁷ bacterias/pez, mientras que tres de ellas se pudieron incluir en la categoría de altamente virulentas al mostrar una LD₅₀ igual o menor de 10⁵ bacterias/pez (Tabla 13).

Tabla 13.- Cálculo de las LD₅₀ de las distintas cepas incluidas en el ensayo de virulencia en rodaballo.

Cepa	Hospedador	Serotipo	DL ₅₀
910315-1/6	Anguila	O1	1 x 10 ⁶
JIP 14/91	Dorada	O1	1,4 x 10 ⁶
JIP 02/92	Dorada	O1	1,6 x 10 ⁷
TW 444	Dorada	O1	9 x 10 ⁴
RQ 174.1	Rodaballo	O1	1 x 10 ⁵
AZ 197.1	Rodaballo	O1	1 x 10 ⁶
AZ 208.1	Rodaballo	O1	1,5 x 10 ⁶
CI 3.1	Besugo	O1	9 x 10 ⁵
TW 10/03	Besugo	O1	3 x 10 ⁶

2. Características de la superficie celular

2.1. Detección de estructuras celulares

Todos los aislados de *P. anguilliseptica* incluidos en este estudio presentaron material capsular que se pudo observar al emplear la tinción de glutaraldehido-lisina-fucsina (Fig. 32). Así, con esa tinción las bacterias aparecían de color oscuro, rodeadas de una envuelta de color rosa que se correspondía con la cápsula.

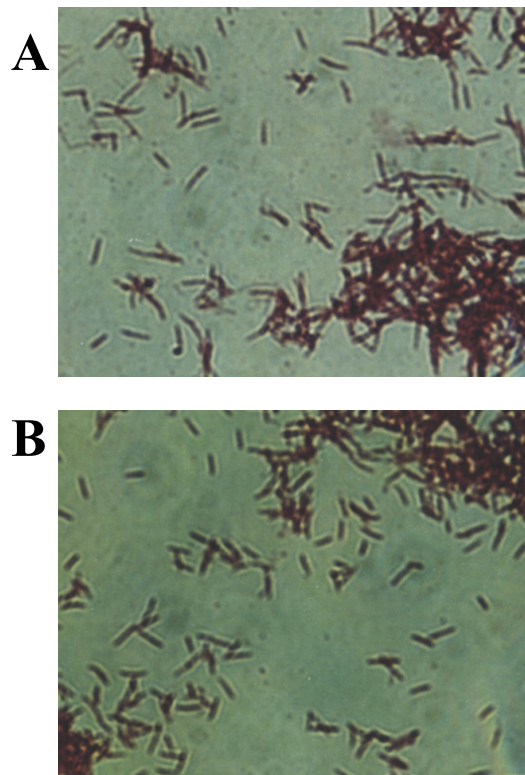


Fig. 32.- Células de *P. anguilliseptica* teñidas con fucsina para la detección de la cápsula.

Factores de Virulencia

2.2. Ensayos de hidrofobicidad.

Teniendo en cuenta los criterios de hidrofobicidad del método ensayado (ver material y métodos), todos los aislados de *P. anguilliseptica* incluidos presentaron valores de hidrofobicidad por debajo del 20%, incluyéndose, por tanto, en la categoría de cepas no hidrofóbicas (Tabla 14).

Tabla 14.- Resultados de los ensayos de hidrofobicidad con hidrocarburos.

Cepas	Hidrofobicidad	
	Octano	Hexadecano
CECT 899	– (0,4%) ^a	– (0,5%)
CECT 2186	– (10%)	– (9,9%)
36/90(3)	– (18,2%)	– (9,3%)
TW-P1	– (8,2%)	– (0%)
C225	– (19,6%)	– (19,8%)
LPAA 11066	– (7,3%)	– (9,4%)
RQ 171.1	– (4,8%)	– (14%)
RQ 174.1	– (8,4%)	– (5,2%)

^a Porcentaje de hidrofibidad

2.3. Hemaglutinación

La capacidad hemaglutinante de *P. anguilliseptica* se realizó utilizando sangre de trucha y rodaballo. En estos ensayos se obtuvo que el 100% de las cepas ensayadas producen aglutininas frente a ambos tipos de eritrocitos (Tabla 15, Fig. 33). Estas hemaglutinaciones fueron sensibles, en la casi totalidad de los casos, al azúcar L-fucosa, pero no a la acción enzimática de la proteínasa K ni al calor (Tabla 15, Fig. 34).

2.4. Adherencia e invasividad

El ensayo para la determinación de la capacidad de adhesión de los aislados de *P. anguilliseptica* se realizó en tres líneas celulares. Los resultados obtenidos indicaron la ausencia de propiedades adherentes de las cepas incluidas en este estudio frente a las tres líneas celulares ensayadas, al encontrarse los porcentajes de adherencia resultantes por debajo de 1, situándose, por tanto, en la categoría de no adherentes según los criterios empleados por Robins-Browne (1994) (Tabla 16).

La capacidad invasiva de los aislados de *P. anguilliseptica*, fue evaluada en las mismas líneas celulares que en el estudio de adherencia. De acuerdo con el criterio descrito por Lawson et al. (1985), los aislados evaluados presentaron índices de invasividad por debajo de 1 en las tres líneas celulares ensayadas. Con fines confirmativos se analizaron los resultados siguiendo el criterio descrito por Janda et al. (1991), observándose de nuevo un carácter no invasivo en los aislados analizados, ya que ninguno alcanzó un número superior a 10^3 bacterias intracelulares.

3. Estudio de los factores extracelulares

3.1. Influencia del método de extracción y del método de cultivo en la composición de los ECP.

El ensayo para determinar el método de extracción de los ECP más adecuado, a partir de cultivos líquidos en agitación o mediante la técnica en placa con membrana de celofán, mostró que en todas las cepas se incrementó la producción de proteínas totales y de proteasas, así como las actividades de los ECP cuando el método de extracción empleado fue en placa. Por otro lado, también se pudo comprobar que la composición de los ECP variaba dependiendo del medio de cultivo empleado, obteniendo mejores resultados a partir de TSA-1 (Tabla 17), ya que en algunos casos en los ECP extraídos de AS no se detectaron ni proteínas ni actividad proteolítica.

Factores de Virulencia

El estudio cuantitativo de proteínas y LPS de los ECP, obtenidos en TSA-1, de las 12 cepas de *P. anguilliseptica* incluidas en esta parte del estudio, mostró una gran heterogeneidad en los contenidos proteicos (de 0,05 a 2,35 mg/ml) (Tabla 16) y de LPS (0,03 a 0,65 mg/ml).

Tabla 15.- Actividad hemaglutinante de cepas de *Pseudomonas anguilliseptica*.

CEPAS	Hemaglutinación ^a		Inhibición de la hemaglutinación con ^b					
	T	R	L-fucosa		Prot. K		Calor	
			T	R	T	R	T	R
CECT 899	+	+	+	+	-	-	-	-
NCIMB 2186	+	+	+	+	-	-	-	-
36/90(3)	+	+	-	+	-	-	-	-
C225	+	+	+	+	-	-	-	-
JIP 14/91	+	+	+	-	-	-	-	-
TW-P1	+	+	+	+	-	-	-	-
TW 444	+	+	+	+	-	-	-	-
LPAA 11705	+	+	+	+	-	-	-	-
LPAA 11066	+	+	+	+	-	-	-	-
RQ 171.1	+	+	+	+	-	-	-	-
RQ 174.1	+	+	+	+	-	-	-	-
AZ 210.1	+	+	+	+	-	-	-	-

^a T, eritrocitos de trucha; R, eritrocitos de rodaballo; +, hemaglutinación positiva.

^b +, inhibición de la hemaglutinación; - : no inhibición.

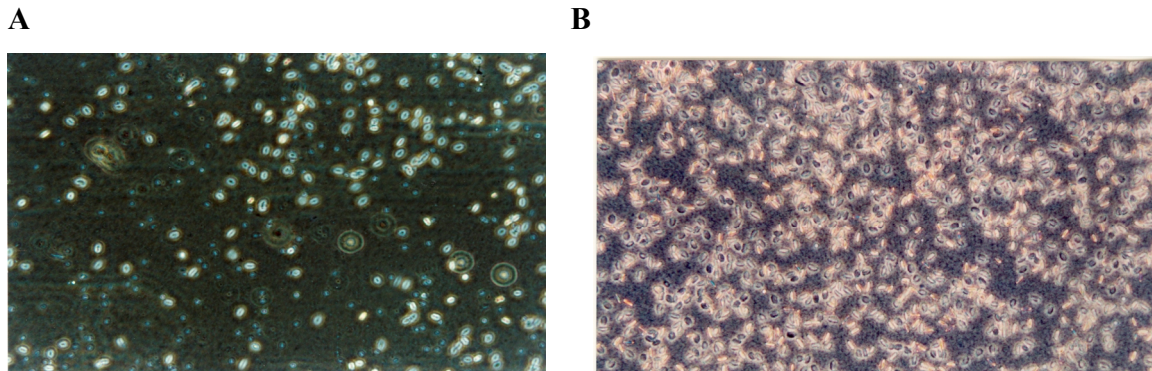


Fig. 33.- Actividad hemaglutinante. A, suspensión de eritrocitos de trucha; B, eritrocitos de trucha en contacto con la cepa de *P. anguilliseptica* 02/92(2).

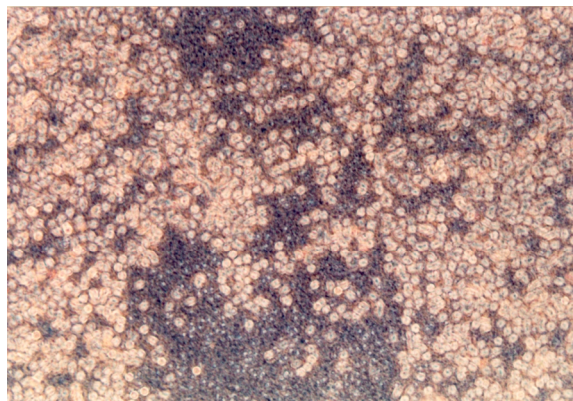


Fig. 34.- Aglutinación de los eritrocitos de trucha en contacto con la cepa 02/92(2) después de la realización del tratamiento para su inhibición con calor.

Factores de Virulencia

Tabla 16.- Resultados de los ensayos de adherencia en las distintas líneas celulares.

Cepa	Inóculo original	Adherencia ^a		
		SAF-1	TV-1	CHSE-214
CECT 899	3 x 10 ⁷	– (0,01)	– (0)	– (0)
NCIMB 2186	1 x 10 ⁷	– (0)	– (0)	– (0)
36/90(3)	1,4 x 10 ⁷	– (0,01)	– (0)	– (0)
C225	2 x 10 ⁷	– (0,01)	– (0,01)	– (0)
JIP 14/91	3 x 10 ⁷	– (0,01)	– (0,01)	– (0)
TW-P1	1,2 x 10 ⁷	– (0)	– (0)	– (0)
TW 444	1 x 10 ⁷	– (0)	– (0)	– (0)
LPAA 11705	1,3 x 10 ⁷	– (0,01)	– (0)	– (0)
LPAA 11066	1,6 x 10 ⁷	– (0,03)	– (0,01)	– (0,01)
RQ 171.1	1 x 10 ⁷	– (0)	– (0,01)	– (0)
RQ 174.1	1,5 x 10 ⁷	– (0,02)	– (0,02)	– (0)
AZ 210.1	2,6 x 10 ⁷	– (0)	– (0,01)	– (0)

^a Porcentaje de células adheridas en las distintas líneas celulares.

3.2. Actividades enzimáticas y citotoxicidad de los ECP.

La actividad proteolítica de los ECP obtenidos de TSA-1 se evaluó mediante métodos colorimétricos, los resultados revelaron un alta variación en la presencia de esta actividad entre las cepas estudiadas, ya que los valores estuvieron comprendidos en el rango entre 0,07 y 8,43 unidades/ml (Tabla 17).

El estudio de actividades enzimáticas específicas mostró que en un 66,6% de las cepas incluidas en esta parte del estudio estaba presente el enzima gelatinasa y sólo en una de ellas el enzima amilasa, para todas las demás actividades obtuvimos un resultado

negativo (Tabla 18). Con el sistema API ZYM, con la mayor parte de los ECP (91,6%) obtuvimos un perfil idéntico al que resultaba al realizarlo con la célula entera (Tabla 19; Fig. 35).

Con la finalidad de conocer si las bajas actividades de los ECP se correspondía a una baja concentración de éstos, se liofilizó una alícuota de cada una de ellos extraídos a partir de TSA-1 con la técnica de membranas de celofán. Los datos resultaron muy similares a los que tuvimos con los ECP sin liofilizar, tanto en las pruebas en placa como con el sistema API ZYM, por lo que esto confirmó que el problema no residía en una baja presencia de estos productos, sino en una baja actividad enzimática de los mismos.

La capacidad citotóxica de los productos extracelulares de *P. anguilliseptica* se evaluó en las líneas de peces SAF-1, TV-1 y CHSE-214. Los resultados obtenidos muestran que sólo una de las cepas ensayadas (TW 444) produjo efectos citotóxicos en las tres líneas celulares, observándose la destrucción parcial del tapiz celular a las 24 h de su inoculación y la destrucción total a las 48 h (Fig. 36).

3.3. Análisis de los componentes proteicos y LPS de los ECP.

Los componentes proteicos y lipopolisacáridicos, se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. Al igual que ocurría con las proteínas totales analizadas anteriormente, en este caso también se observó una gran homología entre los perfiles (Fig. 37). En cuanto al análisis de los LPS no se pudo obtener ninguna información debido a que la concentración presente en los ECP extraídos de los aislados de *P. anguilliseptica* no fue suficiente para su visualización por tinción con nitrato de plata, por lo que se realizó un estudio inmunológico mediante la técnica “Western-blot”. Este ensayo se llevó a cabo con los dos antisueros ya utilizados con anterioridad: CECT 899^T y TW-P1. La reacción de los distintos ECP dejó clara la diferencia de dos grupos, por un lado los ECP extraídos de cepas pertenecientes al serotipo 1 reaccionaban con el suero TW-P1, mientras que los del serotipo 2 lo hacían con el suero CECT 899 (Fig. 38).

Factores de Virulencia

Tabla 17.- Comparación en la composición y actividad proteolítica de los ECP extraídos de diferentes medios

CEPA	TSA-1		AGAR SANGRE	
	Proteína total (mg/ml)	Actividad proteolítica(u/ml)	Proteína total (mg/ml)	Actividad proteolítica(u/ml)
CECT 899 ^T	0,9	3,28	0,49	0,15
NCIMB 2186	1,6	1,04	1,6	3,80
36/90(3)	0,9	1,46	0,8	7,52
C225	0,65	5,12	1,5	0,03
JIP 14/91	2,1	0,78	2,7	0
TW-P1	0,7	0,64	1,25	0,07
TW 444	1,9	4,50	1,6	0,06
LPAA 11705	1,3	0,24	3,4	0,24
LPAA 11066	2,35	0,07	2,25	0,22
RQ 171.1	1,5	0,07	0	0
RQ 174.1	0,450	8,43	0	0
AZ 210.1	0,05	5,82	2,3	0

Tabla 18.- Actividades enzimáticas detectadas en placa en los ECP de *P. anguilliseptica* obtenidos a partir de TSA-1.

Cepa	Actividades enzimáticas ^a							Hemólisis	
	Cas	Ami	Gel	T-20	T-80	Elast	DNasa	Esc	
CECT 899 [†]	-	+	+	-	-	-	-	-	-
NCIMB 2186	-	-	+	-	-	-	-	-	-
36/90(3)	-	-	+	-	-	-	-	-	-
C225	-	-	+	-	-	-	-	-	-
JIP 14/91	-	-	+	-	-	-	-	-	-
TW-P1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TW 444	-	-	+	-	-	-	-	-	-
LPAA 11705	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LPAA 11066	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RQ 171.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RQ 174.1	-	-	+	-	-	-	-	-	-
AZ 210.1	-	-	+	-	-	-	-	-	-

^a cas: caseinasa (LD); Cas, caseinasa; Ami, amilasa; Gel, gelatinasa; T-20, Tween 20; T-80, Tween 80; Elast, elastasa; Esc, esculina.

Factores de Virulencia

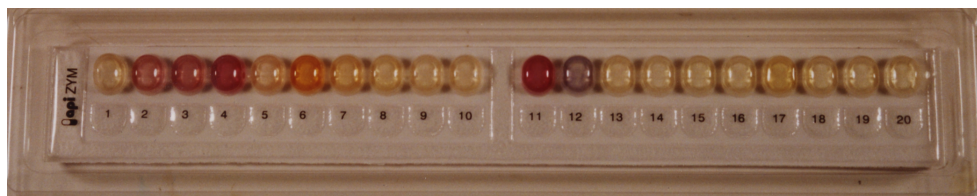


Fig. 35.- Perfil obtenido en el sistema API ZYM con los ECP de las cepas de *P. anguilliseptica*.

Tabla 19.- Perfiles obtenidos para los aislados de *P. anguilliseptica* con el sistema miniaturizado API ZYM.

Cepa	Actividad ^a																			
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
CECT 899 ^T	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
NCIMB 2186	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
36/90 (3)	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
C225	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
JIP 14/91	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
TW-P1	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
TW 444	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
LPAA 11705	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
LPAA 11066	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
RQ 171.1	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
RQ 174.1	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
AZ 210.1	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	

^a 2, fosfatasa alcalina; 3, esterasa; 4, esterasa-lipasa; 5, lipasa; 6, leucina arilamidasa; 7, valina arilamidasa; 8, ciatina arilamidasa; 9, tripsina; 10, α -quimiotripsina; 11, fosfatasa ácida; 12, fosfohidrolasa; 13, α -galactosidasa; 14, β -galactosidasa; 15, β -glucoronidasa; 16, α -glucosidasa; 17, β -glucosidasa; 18, N-acetil- β -glucosaminidasa; 19, α -manosidasa; 20, α -fucosidasa.

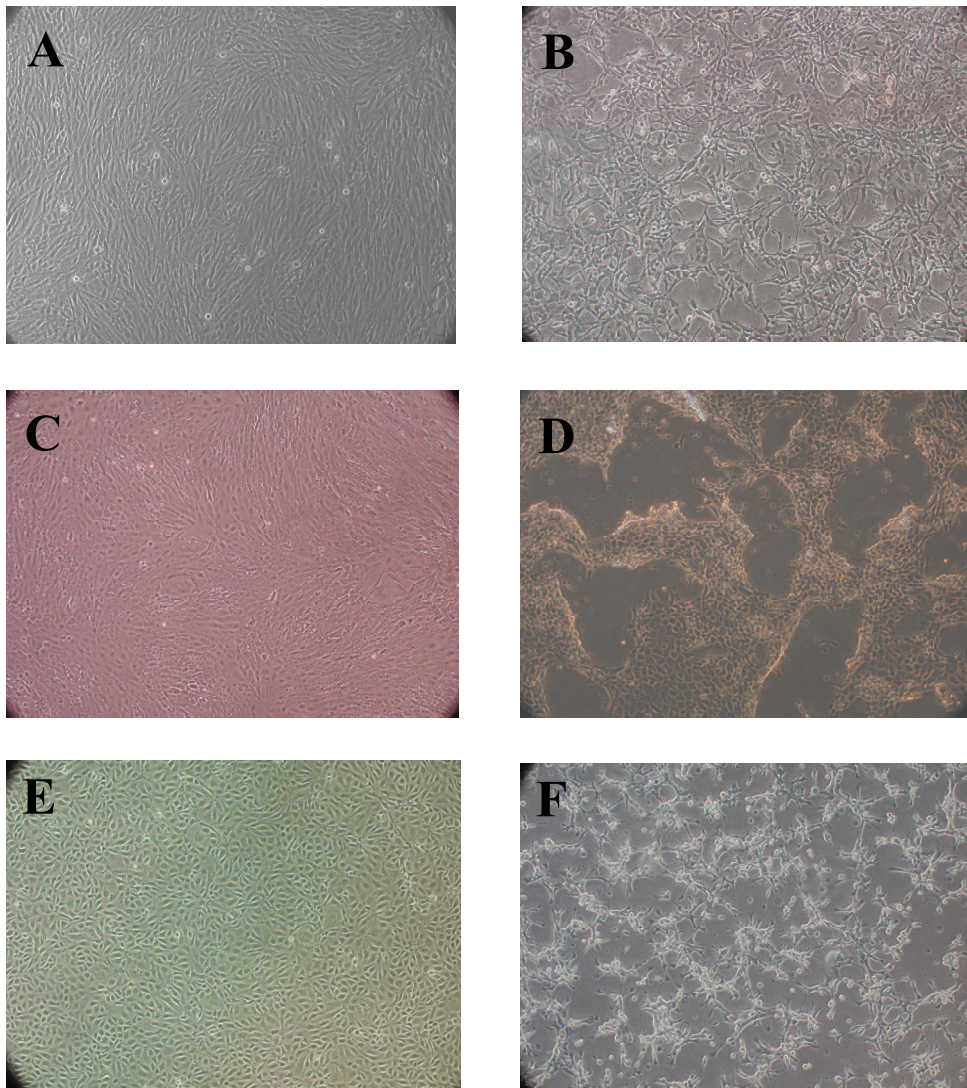


Fig. 36.- Citotoxicidad del ECP de la cepa TW 444 de *P. anguilliseptica* en las tres líneas celulares ensayadas. A, Control negativo de las células TV-1; B, Efecto citotóxico a las 24 h en este línea celular; . C, Control negativo de las células SAF-1; D, Efecto citotóxico a las 36 h en este línea celular; . E, Control negativo de las células CHSE-214; F, Efecto citotóxico a las 24 h en este línea celular. (Aumento total 100 X).

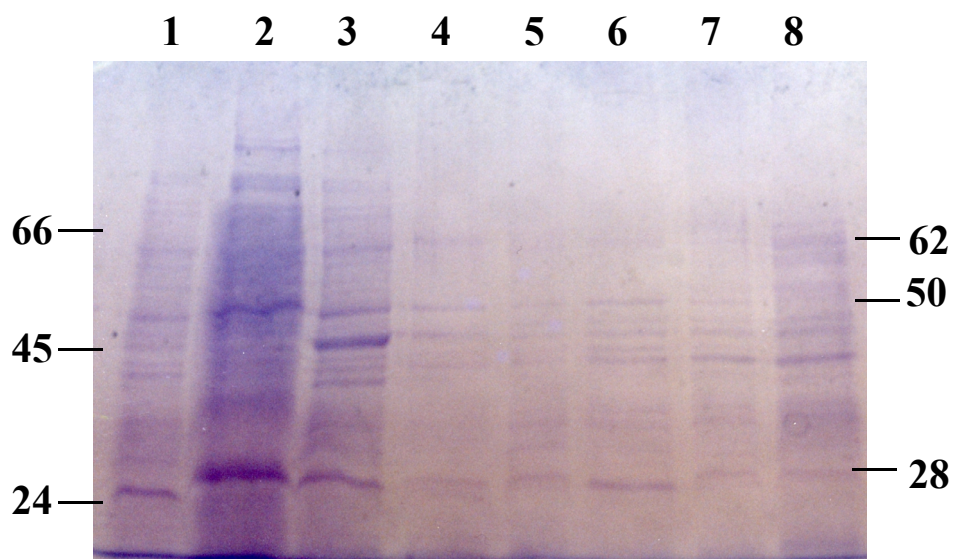


Fig. 37- Análisis en geles de poliacrilamida-SDS de las proteínas presentes en los ECP de las cepas de *Pseudomonas anguilliseptica*. Líneas: 1, CECT 899^T; 2, 36/90 (3); 3, TWP1; 4, JIP 14/91; 5, C225; 6, LPAA11705; 7, LPAA 11066; 8, RQ 171.1. A la izquierda se indica la masa molecular de los marcadores y a la derecha la masa molecular de las proteínas mayoritarias de *P. anguilliseptica* en kDa.



Fig. 38- Estudio de las relaciones inmunológicas de los LPS presentes en los ECP mediante la técnica del “western blot” y los antisueros CECT 899 (A) y TW-P1 (B) Líneas: 1, AZ 210.1; 2, RQ 174.1; 3, LPAA 17705; 4, C225; 5, TW-P1; 6, 36/90(3); 7, NCIMB 2186; 8, CECT 899^T.

3.4. Evaluación de la toxicidad de los productos extracelulares “in vivo”.

La toxicidad de los ECP extraídos de los aislados de *P.anguilliseptica* se evaluó mediante un ensayo de inoculación experimental en rodaballos. Al cabo de una semana después de la inoculación todos los peces se sacrificaron, debido a que no se produjo ninguna muerte por los ECP inoculados.

VI. INMUNOPROFILAXIS DE
P. anguilliseptica

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Ensayos de vacunación por vía intraperitoneal (vacunas acuosas y vacunas adyuvantadas)

1.1. Vacunas acuosas.

Para los ensayos de vacunación se preparó una bacterina acuosa bivalente que incluyó una cepa de *P. anguilliseptica* aislada de dorada en España (TW-P1), perteneciente al serotipo O1, y una cepa de colección (CECT 899^T) aislada de anguila (*A. japonica*), incluida en el serotipo O2.

La bacterina está compuesta por células bacterianas completas, y se preparó de acuerdo a la metodología descrita por Toranzo et al. (1995). A partir de preinóculos en fase logarítmica de crecimiento de cada cepa bacteriana, se inocularon matraces Enlermeyers de 2 l de capacidad conteniendo 1 l de medio TSC-1. Transcurridas 48 h de incubación a 22-24 °C, las células se inactivaron con formaldehído a una concentración final de 0,3% y se mantuvieron en agitación durante 3 h. Al cabo de este período se transfirieron a 4°C durante toda la noche. Finalmente, la concentración se ajustó a una densidad óptica de 0,8 a una absorbancia de 580 nm (lo que equivale aproximadamente a 10⁹ células/ml) con PBS. Las suspensiones finales de las dos cepas se mezclaron en una proporción 1:1 (v/v).

El control de esterilidad se realizó sembrando la mezcla vacunal en placas de TSA-1 y AS, que se incubaron durante 2 días a 22-24°C. El control de especificidad se realizó mediante aglutinación en portaobjetos, utilizando como antígenos las células enteras empleadas en la fabricación de la bacterina y los antisueros anti-CECT 899 y anti-TW-P1, obtenidos en conejos siguiendo la metodología descrita en el apartado 4 del capítulo II de esta memoria.

En la realización de estos ensayos se emplearon ejemplares de rodaballo (peso medio = 6 g) adquiridos en una granja comercial de la zona y mantenidos en tanques con flujo de agua continuo y aireación constante. La temperatura del agua durante los experimentos fue de 11± 1°C. Antes del inicio de los experimentos se seleccionaron 10

ejemplares al azar, los cuales se sometieron a un minucioso examen clínico y bacteriológico para descartar la presencia de *P. anguilliseptica* o de cualquier otro patógeno.

La bacterina se administró por inyección intraperitoneal (i.p), (0,1 ml/pez) a un grupo de 100 peces. Como control se empleó el mismo número de ejemplares inyectados con solución salina estéril.

Transcurridas seis y doce semanas de la inmunización, se realizaron infecciones experimentales, tanto al grupo de peces vacunados como al lote control, con la cepa AZ 197.1 (aislada de rodaballo y perteneciente al serotipo O1). La cepa bacteriana se cultivó en medio AS a 22-24 °C durante 24 h, las células se recogieron y se lavaron en PBS y se resuspendieron en el mismo tampón a una concentración final de 10⁹ bacterias/ml. El número de bacterias viables se determinó por siembra directa de diluciones seriadas de la suspensión original en placas de TSA-1.

Los peces se inocularon intraperitonealmente (i.p.) con una dosis de 2,1 x 10⁶ bacterias/pez (ligeramente superior a su LD₅₀; ver capítulo V). La mortalidad se registró diariamente durante 21 días después de la inyección y los peces muertos se sometieron a examen bacteriológico. Los peces supervivientes fueron sacrificados y examinados de modo similar.

El grado de protección de las vacunas se calculó como el porcentaje relativo de supervivencia (RPS; Amend, 1981), según la fórmula:

$$RPS = 1 - (\% \text{ mortalidad en vacunados} / \% \text{ mortalidad en no vacunados}) \times 100$$

1.2. Vacunas adyuvantadas.

Con la finalidad de determinar la influencia de adyuvantes en la potenciación de la respuesta inmune del pez vacunado, se llevó a cabo un ensayo de vacunación en doradas con la bacterina desarrollada en el laboratorio, adyuvantada con el aceite no mineral Aquamum[®] (Laboratorios Hipra, S.A.).

La emulsión de esta vacuna adyuvantada fue elaborada por la empresa Laboratorios HIPRA, S.A. (España), con la que el Departamento lleva colaborando desde hace varios años en el desarrollo de vacunas para enfermedades de peces.

La eficacia de la vacuna adyuvantada se evaluó, por medio de la empresa Sckretting, en una piscifactoría de doradas del Mediterráneo en la que se vacunó un grupo de 156.000 peces, que se mantuvieron en las condiciones habituales de la planta, y por tanto estuvieron sometidos a la posibilidad de infecciones naturales. El ensayo se comenzó, con la inmunización de los ejemplares, en Octubre de 2001, cuando la temperatura del agua era de $18\pm 2^{\circ}\text{C}$, finalizándolo en el mes de abril de 2002.

Los ensayos se realizaron con ejemplares de dorada de 140 g de peso medio. La vacuna se administró por i.p. (0,1 ml/pez). Como control se empleó un lote de 378.471 peces, que se dejaron sin inocular y en las mismas condiciones que el grupo vacuna. Los peces se mantuvieron, durante todo el experimento, en tanques de tierra de 2000m^3 .

Tanto los ejemplares muertos, como alguno de los supervivientes al ensayo, se sometieron a examen clínico y bacteriológico. El valor de RPS se calculó como en el apartado anterior.

1.3. Análisis estadístico

En todos los experimentos, se determinó el grado de significación de las diferencias en mortalidad entre los grupos de peces mediante la prueba chi-cuadrado. Las probabilidades menores de 0,001 ($P < 0,01$) se consideraron estadísticamente significativas.



Fig. 29.- Vacunación por vía intraperitoneal llevada a cabo en una piscifactoría durante la realización de este trabajo.

RESULTADOS

1. Ensayos de inmunización con vacunas administradas por vía intraperitoneal (i.p.).

Los experimentos de vacunación en rodaballo, llevados a cabo en el laboratorio, mostraron diferencias significativas ($p < 0,01$) entre las mortalidades registradas en los grupos vacunados y control en las dos inoculaciones experimentales realizadas. Los resultados obtenidos demostraron que la bacterina acuosa, administrada por i.p., confirió un alto nivel de protección a las 6 y 12 semanas después de la inmunización con porcentajes relativos de supervivencia del 90 y el 78% respectivamente (Tabla 13).

En el experimento de campo, se observó como la evolución de las temperaturas en la época fría determinó la aparición de pseudomonadiosis en la instalación. En el mes de febrero, cuando la temperatura del agua había descendido hasta los 13 °C de media, comenzaron a observarse síntomas de la enfermedad y las primeras mortalidades en el tanque de los peces no vacunados (Fig. 30). En el análisis patológico realizado en ese momento, se diagnosticó pseudomonadiosis como causante de las mismas, aislándose el patógeno *P. anguilliseptica* en todos los casos. En los peces de tanques vacunados todos los exámenes resultaron negativos. En el análisis realizado en abril, cuando ya no existían mortalidades, tanto la microbiología como la histopatología resultaron negativas en ambos grupos de peces.

Los resultados de protección de la vacuna al finalizar el ensayo se muestran en la Tabla 14. De los resultados obtenidos, se puede inferir que aunque en el lote de peces no vacunados las mortalidades fueron relativamente bajas (1,42%), las producidas en el tanque de peces vacunados fueron significativamente menores (0,06%) ($p < 0,01$), lo que representa un porcentaje de supervivencia relativa (RPS) del 95,77%.

Tabla 13.- Protección conferida por la bacterina acuosa, administrada por i.p, desarrollada contra la Pseudomonadiosis.

Grupo	Inoculación experimental		Protección (RPS) ^a		
	Dosis ^b (Bact./pez)	% Mortalidad		6 semanas	12 semanas
		6 semanas	12 semanas		
Vacunados	2,1 x 10 ⁶	10	22	90	78
No vacunados	2,1 x10 ⁶	100	100		

^a Porcentaje Relativo de Supervivencia

^b Cepa inoculada: AZ 197.1

Tabla 14.- Resultados del ensayo de campo de efectividad y duración de protección de la vacuna adyuvantada administrada por vía i.p a doradas de 140 g.

Grupo de peces	Nº de peces	% Mortalidad	RPS ^a
Vacunado	156.000	0.06	95.77
Control	378.471	1.42	

^a Porcentaje Relativo de Supervivencia

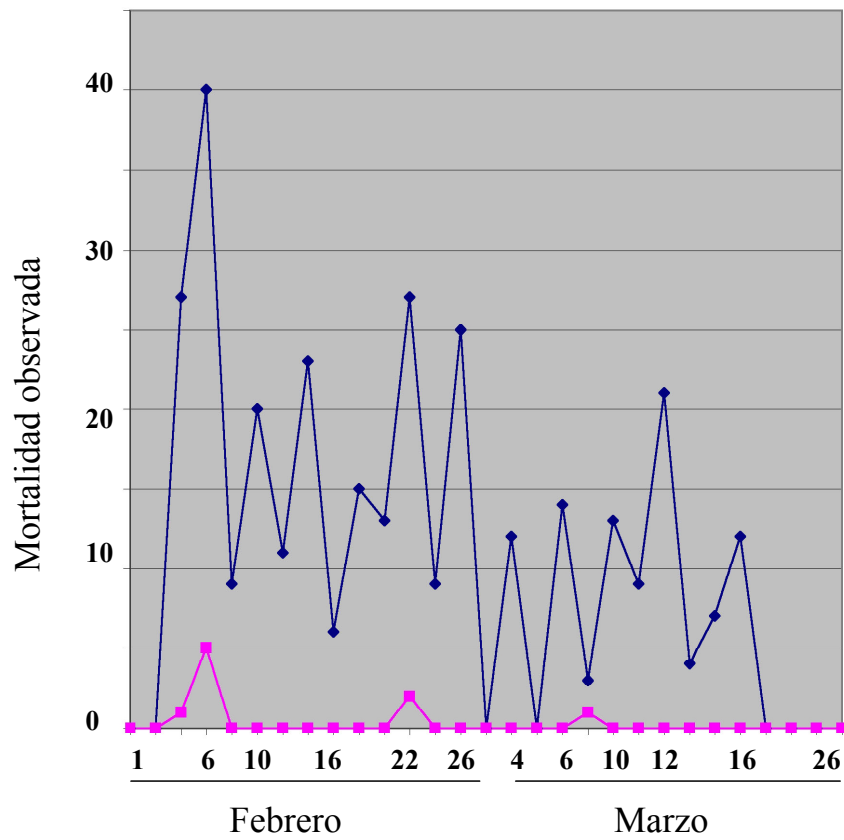


Fig. 30.- Gráfica de las mortalidades registradas durante el experimento de vacunación de doradas en una piscifactoría. (—), peces no vacunados; (—), peces vacunados.

VII. DISCUSIÓN

La dorada y el rodaballo son dos especies de peces muy importantes en acuicultura marina, que en los últimos años están siendo afectadas por una enfermedad emergente causada por *Pseudomonas anguilliseptica*. Dicha enfermedad, conocida como pseudomonadiosis o en el caso de la dorada como “enfermedad de invierno” (“winter disease”), es uno de los factores limitantes del cultivo de un gran número de especies de peces de cultivo en la actualidad (Berthe et al., 1995; Doménech et al., 1997; Austin & Austin, 1999). Además, el rango de hospedadores potenciales aumenta con la introducción de nuevas especies en sistemas de cultivo. De hecho, durante el desarrollo del presente trabajo se obtuvo el primer aislamiento de *P. anguilliseptica* asociada a patología de besugo cultivado.

Este microorganismo se describió originalmente como el agente causal de la enfermedad del punto rojo, una septicemia hemorrágica que afectaba a anguilas japonesas (*A. japonica*) cultivadas. Su distribución geográfica aumentó a lo largo del tiempo, llegando hasta Europa y afectando a diversas especies de peces tanto de cultivo como salvajes (Nakai et al., 1985 a,b; Wiklund & Bylund, 1990; Lönnström et al., 1994; Al-Marzouk, 1999).

Esta enfermedad aparece cuando la temperatura del agua se encuentra por debajo de 16°C durante los meses de invierno. Con la excepción de casos agudos, hay una ausencia de sintomatología clara asociada con la enfermedad lo que, en muchos casos, hace imposible su diagnóstico en las piscifactorías.

Las descripciones realizadas hasta el momento no son muy extensas en cuanto a las características fenotípicas del patógeno (Austin & Austin, 1999). Además, el pobre crecimiento de *P. anguilliseptica* en los medios de cultivo normalmente utilizados, así como su metabolismo no reactivo, hacen difícil su diagnóstico y caracterización (Doménech et al., 1997). De los medios de cultivo utilizados en este estudio, el que resultó más adecuado fue el medio agar sangre en el que las colonias presentaban un mayor diámetro y un crecimiento más rápido que en TSA-1. En consecuencia, el medio agar sangre fue el de elección y utilizado en todos los experimentos del estudio, salvo la excepción mencionada en el estudio de los ECP.

Las características de las cepas de *P. anguilliseptica* incluidas en este estudio son muy similares entre ellas independientemente de su origen geográfico y/o hospedador, siendo todas ellas bacilos Gram-negativos, móviles, oxidasa y catalasa positivos y negativos para el indol y β -galactosidasa. Solamente se han observado diferencias en un número reducido de pruebas como la utilización de citrato, hidrólisis de tween 20 y almidón, crecimiento a 4°C y a una concentración de NaCl del 3%.

Se han observado pequeñas diferencias entre los perfiles fisiológicos, bioquímicos y enzimáticos de nuestros aislados y las descripciones anteriores de este patógeno. Estas inconsistencias son similares a las publicadas por otros autores para cepas de *P. anguilliseptica* aisladas de distintas especies de pez y áreas geográficas (Wiklund & Bylund, 1990; Michel et al., 1992; Lönnström et al., 1994; Kusuda et al., 1995; Berthe et al., 1995; Doménech et al., 1997). Algunas de estas discrepancias podrían explicarse en base a la distinta metodología empleada por los diferentes grupos de investigación, como el crecimiento a distintas temperaturas y salinidades, o por la utilización de distintos medios de cultivo para el desarrollo de las distintas pruebas bioquímicas. Esta hipótesis se confirmó con la prueba de la arginina dihidrolasa, ya que el uso del medio semisólido de Thornley produce reacciones positivas para esta prueba, mientras que en el medio de cultivo de Moeller no se produce reacción debido al pobre crecimiento del microorganismo. Además, otras diferencias se podrían deber al hecho de que algunas características, como la hidrólisis de gelatina, se pierden por sucesivos subcultivos en laboratorio (Michel et al., 1992). Sin embargo, el conjunto de todos los resultados nos han llevado a la identificación de este patógeno como *P. anguilliseptica*.

Al igual que otros patógenos que afectan a peces, *P. anguilliseptica* no está incluida en la base de datos de los sistemas API (bioMerieux). De cualquier modo estos sistemas miniaturizados son comúnmente utilizados en los laboratorios de ictiopatología en todo el mundo (Romalde & Toranzo, 1991; Furones et al., 1993; Austin & Austin, 1999; Ravelo et al., 2001). Los resultados obtenidos en este trabajo utilizando los sistemas API 20NE y API ZYM demostraron claramente la influencia del medio de cultivo y la densidad del inóculo inicial en los perfiles bioquímicos y enzimáticos

obtenidos de los aislados de *P. anguilliseptica*. De este modo, los resultados fueron repetitivos y consistentes siempre y cuando el inóculo procediese de agar sangre y se ajustara espectrofotométricamente. Ravelo et al. (2001) describieron resultados similares en la caracterización de aislados de *Lactococcus garvieae* con el sistema RAPID ID 32 Strep. Utilizando estas condiciones optimizadas, se observó una alta homogenicidad entre los aislados de *P. anguilliseptica* del estudio en la mayoría de las pruebas bioquímicas incluidas en estos sistemas miniaturizados, obteniéndose resultados variables en la detección de la asimilación del caprato, donde el 20% de los aislados son negativos en la utilización de este carbohidrato. Además, se detectaron resultados falso-negativos en la prueba de la arginina dihidrolasa, cuando los resultados se compararon con los obtenidos utilizando el medio de Thornley. La existencia de reacciones falso-negativas y/o falso-positivas en algunas de las pruebas ya había sido descrita para bacterias aisladas de peces (Kent, 1982; Grisez et al., 1991; Santos et al., 1993).

De acuerdo con la base de datos de API, los aislados de *P. anguilliseptica* serían erróneamente identificados como *P. pseudoalcaligenes* o como *Brevundimonas diminuta*. Mientras que *P. pseudoalcaligenes* está descrita como un potencial patógeno oportunista de peces (Austin & Austin, 1999) y, por tanto, su aislamiento a partir de peces enfermos sería posible, *B. diminuta* nunca se ha aislado a partir de peces. Además, esta especie no presenta capacidad de crecimiento a 4°C y necesita diversos factores de crecimiento como pantonato, biotina o cianocobalamina (Palleroni, 1984), lo que permitiría su fácil diferenciación. Por otro lado, la diferenciación entre *P. anguilliseptica* y *P. pseudoalcaligenes* puede evaluarse por la capacidad de esta última de crecer a 41°C (Austin & Austin, 1999).

Con respecto a la sensibilidad de los aislados a los diferentes agentes quimioterápicos, todas las cepas resultaron muy sensibles a los compuestos ensayados. Solamente dos cepas francesas, una aislada de dorada y otra de rodaballo, y la cepa finlandesa aislada de arenque presentaron resistencia a la ampicilina y al trimetoprim-sulfametoxazol y un total de 27 cepas sólo este último quimioterápico. Algunas de estas resistencias podrían explicarse por el empleo abusivo de estos quimioterápicos en las instalaciones de acuicultura en esos países (Brown, 1989). De hecho, estos dos agentes

fueron propuestos como tratamiento de elección para esta enfermedad en Finlandia en el año 1990 (Wiklund & Bylund, 1990).

Por otro lado, se ha descrito que algunos de estos quimioterápicos efectivos “in vitro”, como la oxitetraciclina y el ácido oxolínico, no han funcionado a nivel de campo si no se elevaba paralelamente la temperatura a valores superiores a 17-18°C (Doménech et al., 1997). Como se ha demostrado que un aumento de la temperatura puede por si solo actuar como un método de control de la enfermedad, no se puede asegurar que estos compuestos quimioterápicos hayan tenido alguna efectividad “in vivo”.

En estudios realizados con anterioridad por Nakai et al. (1981, 1982, 1985a) se había indicado la existencia de tres tipos antigénicos en *P. anguilliseptica*, comprendiendo respectivamente las cepas aisladas de anguila con cápsula (serotipo K⁺-1), cepas aisladas de anguila sin cápsula (serotipo K-) y cepas aisladas de ayu con cápsula (serotipo K⁺-2). En cuanto a los aislados Europeos, solamente el aislado escocés procedente de anguila europea y algunas cepas finlandesas procedentes de salmónidos y *Coregonus* sp., se asignaron al tipo II (K-) y III respectivamente (K⁺-2) dentro del esquema serológico japonés (Nakai & Muroga, 1982; Wiklund & Bylund, 1990).

Por este motivo, uno de los objetivos de este trabajo consistió en la caracterización serológica de una colección de aislados europeos de *P. anguilliseptica*, con el propósito de determinar la posible existencia de variabilidad antigénica dentro de esta especie.

Tomando como referencia los estudios antes mencionados, se prepararon dos antisueros utilizando una cepa de referencia, CECT 899 (aislada de anguila en Japón), y una cepa española, TW-P1 (aislada de dorada). El empleo de estos antisueros mediante distintas técnicas como aglutinación en portaobjetos, microtitulación y “dot blot” con células enteras (antígenos O/K/H) demostraron claramente la existencia de dos grupos serológicos dentro de los aislados europeos de *P. anguilliseptica*. La aplicación de esa

metodología a los antígenos O extraídos de los aislados del estudio, evidenciaron que las diferencias antigénicas encontradas procedían de variaciones en el antígeno O termoestable, y no con moléculas inmunogénicas termolábiles como había sido sugerido por Nakai et al. (1981, 1982). De hecho, se comprobó que todos los aislados europeos incluidos en este trabajo producen material capsular y, por ese motivo no se pudo encontrar ningún aislado perteneciente al grupo serológico K- (tipo II japonés). Por otro lado, para explicar la presencia de estos dos grupos: capsulados y no capsulados, se ha sugerido que el subcultivo sucesivo de los aislados en el laboratorio, puede inducir la pérdida de los antígenos K (Nakai et al., 1981). Si esta hipótesis es cierta, el tipo serológico II propuesto en los trabajos japoneses no existiría en el medio ambiente, siendo originado por un continuo mantenimiento de los aislados en el laboratorio.

Hay que destacar que la técnica de aglutinación en portaobjetos, especialmente cuando se emplean células enteras, no resulta de mucha utilidad para el diagnóstico confirmativo de *P. anguilliseptica*, ya que se han detectado reacciones cruzadas con representantes de grupos bacterianos próximos, como *P. marinobacter*, *Marinomonas* y *Deleya*. Por tanto, es importante utilizar el antígeno “O” termoestable en el caso de diagnóstico serológico confirmativo.

El análisis de lipopolisacáridos de la membrana externa de la pared celular mediante su separación en geles de SDS-PAGE demostraron la presencia de dos perfiles electroforéticos diferentes que agrupan a los aislados de *P. anguilliseptica* de modo similar a las técnicas de aglutinación y dot blot. Los ensayos de “western blot” realizados utilizando antisueros específicos TW-P1 y 899, confirmaron los resultados de SDS-PAGE y que la variabilidad serológica detectada tenía su origen en variaciones en los LPS de la pared celular (antígeno O) de los aislados y, por tanto, los dos grupos serológicos eran de hecho dos O-serotipos (serotipo O1 y serotipo O2) dentro de *P. anguilliseptica*.

Este esquema de serotipado podría tener utilidad epidemiológica ya que en base a nuestros resultados y a los publicados por otros autores (Nakai et al., 1981, 1985 a,b) se puede suponer que la mayoría de las cepas europeas pertenecerá al serotipo O1

mientras que los aislados japoneses serán en su práctica totalidad del serotipo O2. Desafortunadamente, el único aislado en común entre este trabajo y los realizados por autores Japoneses (Nakai et al., 1981, 1982, 1985a) es la cepa tipo CECT 899^T, que fue descrito como perteneciente al tipo I japonés, mientras que en nuestro estudio se incluyó en el serotipo O2. Es necesario el desarrollo de futuros estudios para poder aclarar esta cuestión.

El análisis de proteínas totales y de membrana externa muestra que todas las cepas de *P. anguilliseptica* analizadas, independientemente de su origen geográfico y de la fuente de aislamiento, presentan un perfil proteico similar. Estos resultados concuerdan con los ya publicados por otros autores (Nakajima et al., 1999), que señalan que las proteínas de membrana externa son útiles para demostrar la similitud entre diferentes aislados de este patógeno. Además, en los experimentos de “western blot” se ha podido demostrar la homología inmunológica existente entre las proteínas de los distintos aislados de *P. anguilliseptica*.

El análisis del contenido plasmídico de las cepas incluidas en el presente estudio mostraron distintos perfiles dependientes del origen de hospedador de los aislados. Tanto las cepas pertenecientes al serotipo O1 como al O2, compartían todos los plásmidos de bajo peso molecular (4; 2,6 MDa). Los aislados de dorada, dos aislados de rodaballo (RQ 174.1 y RQ 174.2) y una cepa aislada a partir de anguila europea (910315-1/6) mostraron además otra banda extracromosómica (38 MDa). No fue posible establecer relaciones entre el contenido plasmídico y presencia de determinadas características fenotípicas, ni tampoco se ha encontrado relación entre la presencia o ausencia del plásmido de alto peso molecular con resistencia a antimicrobianos.

A pesar de la alta homogeneidad fenotípica observada entre los aislados de *P. anguilliseptica*, el estudio genético realizado por los métodos RAPD, ERIC y REP-PCR permitió detectar variabilidad intraespecífica dentro de esta especie bacteriana. Resultados similares se obtuvieron en un estudio con aislados de *P. anguilliseptica*

procedentes de España y Portugal por la técnica de electroforesis en campos pulsados (Blanco et al., 2002). El análisis por RAPD, distribuyó los aislados estudiados en dos grandes grupos genéticos, incluyéndose en uno las cepas aisladas de anguila, mientras que el otro lo comprendían la práctica totalidad de los aislados procedentes de otras especies como dorada y rodaballo, coincidiendo esta distribución de los aislados con los dos serotipos (O2 y O1) descritos con anterioridad. Las técnicas de ERIC-PCR y REP-PCR fueron más discriminantes, distinguiendo además entre las cepas de dorada y rodaballo, estableciéndose por tanto tres grupos relacionados con el hospedador de origen. En base a estos resultados, las tres técnicas se pueden considerar útiles para la realización de estudios epidemiológicos de este patógeno de peces, quedando la elección de una de ellas sujeta a las necesidades, disponibilidad de materiales y economía de cada laboratorio.

Con la finalidad de determinar la relación entre la virulencia de los aislados de *P. anguilliseptica* y el origen de hospedador, se inocularon intraperitonealmente ejemplares de rodaballo con diferentes concentraciones de bacterias aisladas a partir de distintas especies de pez. La mayoría de las cepas probadas resultaron ser moderadamente virulentas (10^6 bacterias/pez), excepto tres aislados (TW 444, aislado a partir de dorada; RQ 174.1, procedente de rodaballo y CI 3.1 aislado de besugo), con los que se obtuvieron LD_{50} menores o igual a 10^5 bacterias/pez, y por tanto se englobarían en la categoría de altamente virulentas. De acuerdo a los resultados obtenidos, las cepas de *P. anguilliseptica* no presentan especificidad de huésped, ya que independientemente de su origen de hospedador fueron capaces de causar la muerte de los alevines de rodaballo. Además, este patógeno posee la capacidad de infectar a una gran variedad de peces de importancia comercial (Toranzo et al., 2005), por lo que es importante tomar precauciones para evitar la posible diseminación de esta enfermedad.

No se sabe mucho sobre los factores de virulencia de *P. anguilliseptica*. Se ha sugerido que las características de la superficie celular relacionadas con la adherencia bacteriana, tales como la actividad hemaglutinante y la hidrofobicidad pueden jugar un

papel importante en los primeros pasos de la infección (Trust et al., 1983; Daly & Stevenson, 1987; Ofek & Doyle, 1994).

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la mayoría de las cepas evaluadas produjeron hemaglutininas frente a eritrocitos tanto de rodaballo como de trucha. En general, estas hemaglutinaciones fueron sensibles al tratamiento con el carbohidrato L-fucosa, lo que sugiere que este azúcar o un análogo del mismo forma parte del receptor eritrocitario para las adhesinas bacterianas. Resultados similares se obtuvieron en otros patógenos de rodaballo, como *Vibrio anguillarum* (Toranzo et al., 1983) y *Streptococcus parauberis* (Romalde et al., 2000).

Sin embargo, los ensayos de hidrofobicidad a hidrocarburos (BATH) y adherencia a líneas celulares eucariotas, rindieron resultados negativos indicando la no hidrofobicidad de los aislados así como su falta de capacidad adherente. Probablemente esto se deba a que el material capsular actúe interfiriendo en el carácter hidrofóbico de la superficie celular, así como enmascarando los componentes implicados en los procesos de adhesión, al igual que ocurre en otros patógenos bacterianos (Jacques et al., 1993; Magariños et al., 1996). Además, los aislados de *P. anguilliseptica* resultaron ser no invasivos, independientemente de la línea celular utilizada y del criterio utilizado para la determinación de esta característica celular.

También se ha indicado la posible participación de la cápsula como determinante de virulencia (Nakai, 1985). En este estudio se ha detectado la presencia de material capsular en la totalidad de las cepas estudiadas.

Es bien conocido que la patogenicidad de una especie bacteriana requiere de la expresión de múltiples factores de virulencia (Griffiths, 1987), lo que evidencia el carácter multifactorial del mecanismo de patogenicidad. Por este motivo, el siguiente paso fue encaminarse hacia el estudio de los factores extracelulares de virulencia.

La evaluación de los ECP comenzó por determinar el método de extracción y el medio de cultivo que rindieran una mayor concentración de proteínas. Como ya había

sido descrito anteriormente para otros patógenos de peces la técnica en placa con celofán (Liu, 1957) fue la que mostró una mayor eficacia (Inamura et al., 1984; Amaro et al., 1992; Magariños et al., 1992; Santos et al., 1996). Entre los métodos de cultivo ensayados, el elegido fue TSA-1 por mostrar resultados constantes en todos los ensayos realizados. Estas condiciones fueron las utilizadas a partir de este momento en todos los estudios realizados.

Se ha sugerido por algunos investigadores que en base al periodo necesario para causar mortalidad en infecciones experimentales, algunas actividades metabólicas, incluyendo determinados exoenzimas o exotoxinas como proteinasas y lipasas, podrían estar implicadas en la patogénesis de este microorganismo (Austin & Austin, 1999). La actividad proteolítica total de nuestras cepas, resultó muy variable dependiendo del aislado (entre 0,07-8,43 U/ml), y sin ninguna correlación entre ésta y el contenido total de proteínas. Además cabe destacar la ausencia de producción de proteasas específicas determinada en los ensayos en placa, mostrando sólo actividad gelatinasa un 66,6% de las cepas.

Por otro lado, con el empleo del sistema miniaturizado API ZYM en las cepas europeas de *P. anguilliseptica*, obtuvimos en un 91,6% de los ECP ensayados el mismo perfil ya mostrado con anterioridad con las células enteras, con presencia de actividades como fosfatasa alcalina, esterasa y esterasa-lipasa, o fosfohidrolasa que podrían estar implicadas en el proceso de patogénesis. En los ECP de la cepa TW 444 se observó además actividad tripsina arilamidasa, siendo esta cepa la única con potencial citotóxico en todas las líneas celulares incluidas en el estudio.

La ausencia en las cepas de *P. anguilliseptica* de la mayoría de los factores de virulencia estudiados en el presente trabajo hacen necesario el estudio futuro de otras características como la presencia de sistemas de captación de hierro y su posible implicación en la virulencia de este microorganismo, cuya importancia ha sido demostrada en otros patógenos de peces (Lemos et al., 1991; Romalde et al., 1991; Magariños et al., 1994; Igarashi et al., 2002).

Por otro lado, se han descrito diferentes factores que pueden predisponer al pez, concretamente en el caso de la dorada, a adquirir la pseudomonadiosis. Así, las temperaturas bajas del agua en los meses de invierno parecen favorecer el desarrollo de la enfermedad por la reducción drástica de la ingesta en esas condiciones, lo que causa una alteración general por el aumento de lípidos hepáticos y la degradación de proteína muscular (Tort et al., 1998a). Además, se altera el intercambio iónico en las células del pez por cambios en la funcionalidad y fluidez de las membranas (Tort et al., 1998a). Por otro lado, en estas condiciones, se ha observado también un aumento de los niveles de cortisol, así como una disminución del complemento, de la actividad lisozima, y de la cantidad de linfocitos circulantes, lo que desencadena en una inmunodepresión de los peces (Tort et al., 1998b).

Esta hipótesis estaría apoyada por el hecho de que la mayor parte de los brotes de pseudomonadiosis aparecen al bajar la temperatura de 16°C, produciéndose las mayores mortalidades en el rango entre 9 y 13°C (Berthe et al., 1995), de ahí que se denomine también como síndrome de invierno (“winter disease”) de la dorada. En este sentido, se ha sugerido la posibilidad de que *P. anguilliseptica* sea un patógeno oportunista, que normalmente forme parte de la microbiota normal de esta especie de pez, pero que en condiciones de inmunosupresión puede ser capaz de desencadenar la enfermedad (Doménech et al., 1997; Tort et al., 1998 a,b, 2004).

En base a todo lo expuesto, es clara la necesidad de llevar a cabo estudios multidisciplinares en profundidad, que incluyan aspectos microbiológicos, fisiológicos e inmunológicos, para conseguir un entendimiento completo de los procesos relacionados con el desarrollo de esta enfermedad en las distintas especies de peces a las que afecta.

En los últimos años se han publicado numerosos trabajos que describen protocolos de PCR para la detección de la mayor parte de los patógenos bacterianos de importancia en la acuicultura marina mundial (Hiney & Smith, 1998; Osorio et al., 1999; Cunningham, 2002; Romalde & Toranzo, 2002). Sin embargo, se ha investigado poco sobre la detección de *P. anguilliseptica* mediante técnicas moleculares. En este trabajo se ha desarrollado un protocolo rápido y específico para la detección de este patógeno. Los resultados obtenidos muestran una especificidad del 100% en todos los aislados ensayados y no se observó la presencia de reacciones cruzadas con otros microorganismos patógenos para peces. Los resultados de sensibilidad con cultivos puros muestran que la detección mínima de DNA es de 0,7 pg/tubo PCR, que corresponden aproximadamente a 1-20 células bacterianas, estando en el mismo rango de los obtenidos para otros patógenos bacterianos de peces (Hiney & Smith, 1998; Osorio et al., 1999). Además, cuando el protocolo de PCR se aplicó a DNA extraído a tejidos infectados “in vitro” se obtuvo una sensibilidad similar.

Recientemente, Blanco et al. (2002) describieron un protocolo de PCR para la detección de *P. anguilliseptica* en un periodo de 8 h y con un límite de detección de 1×10^4 cél/ml (lo que corresponde a 170-200 bacterias/tubo PCR). El método desarrollado en nuestro laboratorio no sólo es más sensible (al menos 100 veces más), sino que presenta un tiempo de realización de aproximadamente 2 h 15 min, desde la obtención de los tejidos hasta la obtención de los resultados finales. Por otro lado, en el estudio de Blanco et al. (2002), todos los aislados de *P. anguilliseptica* ensayados (con excepción de dos cepas portuguesas) eran españoles. Como ya se ha comentado con anterioridad, por técnicas genéticas (RAPD, ERIC-PCR y REP-PCR) se demostró la existencia de al menos dos grupos genómicos dentro de la especie, perteneciendo todos los aislados españoles al mismo grupo. En el presente trabajo, se incluyeron aislados procedentes de distintas áreas geográficas y de distintos hospedadores, demostrando de esta forma la aplicabilidad del método desarrollado para la detección de este patógeno independientemente de su origen.

Se han descrito diferencias importantes entre la utilización de tejidos sanos infectados “in vitro” con aquellos tejidos obtenidos de peces enfermos (Hiney & Smith, 1998), que pueden ser debidas a la accesibilidad del patógeno y/o presencia de inhibidores de la PCR. Por tanto, el método de PCR desarrollado se ensayó con DNA extraído de órganos de peces infectados experimentalmente. Se obtuvo una amplificación positiva en todos los tejidos de peces infectados, incluso en aquellos inoculados con concentraciones bacterianas inferiores a la LD₅₀, mientras que no se observó amplificación en tejidos no infectados utilizados como control negativo. Los resultados obtenidos en el análisis de muestras naturales claramente validan el método para su uso en campo, ya que no sólo fue posible detectar el patógeno en tejidos procedentes de peces enfermos, sino también en peces aparentemente sanos.

Es interesante destacar el hecho de que los resultados obtenidos en peces portadores sugieren la existencia de cierto tropismo de *P. anguilliseptica* por el tejido cerebral. Estos resultados confirman los obtenidos por otros autores que describieron la existencia de encefalitis granulomatosa en dorada asociada a la presencia de este patógeno (Padrós et al., 1999). Se recomienda, por tanto, la utilización de este ensayo para el diagnóstico de la pseudomonadiosis

Debido a que la PCR en tiempo real (rt-PCR) ofrece frente a la PCR convencional una mayor rapidez y sensibilidad, así como un menor riesgo de contaminación, en este trabajo se ha desarrollado un protocolo de rt-PCR para la detección de este patógeno. Los cebadores utilizados en las distintas reacciones de rt-PCR fueron los mismos que en la PCR convencional.

Con este protocolo se obtuvo también una especificidad del 100%, al no producirse reacciones cruzadas con el DNA de otras especies bacterianas incluidas en el estudio. Además no se ha detectado en ninguna de las reacciones realizadas la presencia de amplificaciones secundarias no específicas o dímeros de cebadores, comprobando en el análisis de curvas de fusión la presencia de un sólo pico, que se corresponde con un sólo fragmento de DNA. Estos resultados concuerdan con otros trabajos realizados

sobre la especificidad de la técnica rt-PCR (Nogva & Lillehaug, 1999; Novga et al., 2000; Vishnubhatla et al., 2000; Bilodeau et al., 2003).

Los resultados del ensayo de sensibilidad realizados con DNA extraído a partir de cultivos puros de *P. anguilliseptica* indicaron niveles de detección mínimo de DNA (3,5 fg) superiores a los conseguidos con el protocolo de PCR convencional. En cuanto a la sensibilidad obtenida con DNA extraído de tejidos infectados “in vitro” fue de 1 bacteria/20 mg de tejido.

Al igual que en el caso de la PCR convencional, los ensayos realizados con DNA extraído a partir de tejidos de peces infectados experimentalmente, mostraron la presencia de amplificaciones positivas tanto en el caso de peces muertos durante los experimentos de inoculación experimental como en aquellos que sobrevivieron y fueron sacrificados al finalizar éste (portadores asintomáticos). La principal ventaja de este protocolo de rt-PCR frente al de PCR convencional, es el menor tiempo necesario para la obtención de resultados, especialmente en el caso de muestras sintomáticas (Ct \approx 14-16), ya que no se necesita completar los 40 ciclos de amplificación para obtener resultados concluyentes. Además, presenta una mayor sensibilidad que la PCR convencional por lo que puede ser de mayor utilidad para detectar individuos portadores.

La investigación futura se encaminará a la optimización de esta técnica para la detección del patógeno *P. anguilliseptica* a partir de otro tipo de muestras cuya recogida sea incruenta. De esa manera sería factible llevar a cabo controles en piscifactorías durante los meses favorables a la aparición de brotes infecciosos de esta enfermedad, para aplicar las medidas paliativas o preventivas adecuadas.

Ya hemos mencionado con anterioridad en esta memoria que la mayoría de los quimioterápicos efectivos “in vitro”, como la oxitetraciclina y el ácido oxolínico, no han funcionado a nivel de campo. La utilización irracional de estos antibióticos en brotes de pseudomonadiosis podrían dar lugar a la paracición de resistencias en el patógeno, además de constituir un riesgo para la salud pública y el medio ambiente. Por tanto, es

Discusión

deseable el desarrollo de medidas preventivas, entre las cuales la más adecuada es la vacunación.

La importancia de la vacunación como principal medida preventiva de la pseudomonadiosis se confirma con los altos niveles de protección obtenidos con las vacunas desarrolladas, tanto la bacterina acuosa, con niveles de RPS en rodaballo del 90% y del 78% a las 6 y 12 semanas respectivamente, como con la vacuna adyuvantada con la que se alcanzó una supervivencia relativa del 95,77% a los 6 meses de la inmunización en dorada. Esto indica que cualquiera de las vacunas desarrolladas puede ser un método de prevención eficaz contra la pseudomonadiosis de peces. En la actualidad se están llevando a cabo estudios para determinar la duración total de la protección y establecer un programa de vacunación adecuado para cada una de estas especies.

VIII. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que:

- 1.- Las cepas de *Pseudomonas anguilliseptica* aisladas de dorada, rodaballo y besugo en distintas áreas geográficas españolas, presentan una gran homogeneidad en sus propiedades fenotípicas que, por otro lado, fueron coincidentes con la descripción de esta especie bacteriana.
- 2.- Los estudios antigénicos revelaron la existencia de dos serotipos O en la especie *Pseudomonas anguilliseptica*, debidos a diferencias en el antígeno somático (LPS). Estos serotipos presentan utilidad potencial para estudios epidemiológicos ya que pudieron relacionarse con el hospedador de origen de las cepas.
- 3.- La caracterización molecular de los aislados de *Pseudomonas anguilliseptica* mediante técnicas basadas en la PCR (RAPD, ERIC-PCR y REP-PCR) evidenciaron cierta variabilidad genética intraespecífica en este patógeno de peces. Los distintos grupos genéticos pudieron relacionarse con los grupos serológicos y con el origen de los aislados.
- 4.- Las cepas de *Pseudomonas anguilliseptica* se clasificaron en las categorías de altamente o moderadamente virulentas, y no presentaron especificidad de hospedador.
- 5.- No se puede establecer una relación clara y concluyente entre la patogenicidad de las cepas y la presencia de los factores de virulencia, tanto celulares como extracelulares, analizados. Son necesarios más estudios para conocer realmente el proceso de desarrollo de esta enfermedad de peces.

- 7.- Los protocolos de PCR convencional y PCR en tiempo real desarrollados en este trabajo muestran una gran especificidad y sensibilidad en la detección de *Pseudomonas anguilliseptica*, siendo de gran utilidad para el diagnóstico de la pseudomonadiasis de peces, tanto en casos clínicos como de portadores.

- 8.- La formulación vacunal diseñada en el presente estudio es altamente efectiva, tanto en su forma acuosa (bacterina) como en su forma adyuvantada con aceite no mineral, cuando la inmunización se realiza por vía intraperitoneal. La inclusión de ambos serotipos O en dicha formulación hace que sea potencialmente aplicable a cualquiera de las especies susceptibles a la infección por *Pseudomonas anguilliseptica*.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Ahne, W., Popp, W. & Hoffmann, R.** 1982. *Pseudomonas fluorescens* as a pathogen of Tench. (*Tinca tinca*). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **4**: 56-57.
- Allan, B.J. & Stevenson, R.M.W.** 1981. Comparative pathogenicity study on antigenically variant strains of *Enterococcus seriolicida*. *J. Fish Dis.* **19**: 39- 46.
- Al- Marzouk, A.E.** 1999. Association of *Pseudomonas anguilliseptica* with mortalities in cultures marined orange-spotter grouper *epinephelus cocoides* in Kuwait. *Fish Pathol.* **34**: 167-168.
- Alonso, M.C., Cano, I., García-Rosado, E., Castro, D., Lamas, J., Barja, J.L. & Borrego, J.J.** 2005. Isolation of lymphocystis disease virus from sole, *Solea senegalensis* Kaup, and blackspot sea bream, *Pagellus bogaraveo* (Brünnich). *J. Fish Dis.* **28**: 221-228.
- Amaro, C., Biosca, E.G., Esteve, C., Fouz, B. & Toranzo, A.E.** 1992. Comparative study of phenotypic and virulence properties in *Vibrio vulnificus* biotypes 1 and 2 obtained from a European farm experiencing mortalities. *Dis. Aquat. Org.* **13**: 29-35.
- Amend, D.F.** 1981. Potency testing of fish vaccines. *Dev. Biol. Stand.* **49**: 447-454
- Amos, K.H.** (ed). 1985. Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens, 3rd ed. Fish Health Section, American Fisheries Society, Corvallis, Oregon.
- Austin, B. & Austin, D.A.** (eds). 1999. Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish. 3rd ed. Praxis Publishing LTD. Chichester UK.
- Austin, B. & Stobie, M.** 1992. Recovery of *Serratia plymuthica* and presuntive *Pseudomonas pseudoalcaligenes* from skin lesions in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), otherwise infected with enteric redmouth. *J. Fish Dis.* **15**: 541-543.
- Avendaño-Herrera, R., Magariños, B., López-Romalde, S., Romalde, J.L. & Toranzo, A.E.** 2004. Phenotypic characterization and description of two major O-serotypes in *Tenacibaculum maritimum* strains from marine fishes. *Dis. Aquat. Org.* **58**: 1-8.
- Barnabe, G.** 1990. Rearing bass gilthead seabream. In: Barnabe, G. (ed) . *Aquaculture*, vol.2. Ellis Horwood, Londres, UK. Pp: 647-686.
- Bercovier, H., Ghittino, C. & Eldar, A.** 1997. Immunization with bacterial antigens: infections with streptococci and related organisms. En: Gudding, R., Lillehaug, A., Midtlyng, P.J. & Brown, F. (eds.). *Fish vaccinology*. Karger, Basel, Switzerland. pp: 153-160.
- Berthe, F.J.C., Michel, C. & Bernadet, J.F.** 1995. Identification of *Pseudomonas anguilliseptica* isolated from several fish species in France. *Dis. Aquat. Org.* **21**: 151-155.

Bilodeau, A. Lelania & Waldbieser, Geoffrey C. 2003. A real-time polymerase chain reaction assay of the bacterium *Edwardsiella ictaluri* in Channel catfish. *J. Aquat. An. Health.* **15**: 80-86.

Birnboim, H & Doly, J. 1979. A rapid extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleid Acid Res.*, **7**: 1513-1525.

Blanco, M.M., Gibello, A., Vela, A.I., Moreno, M.A., Domínguez, L. & Fernández-Garayzábal, J.F. 2002. PCR detection and PFGE DNA macrorestriction análisis of clinical isolates of *Pseudomonas anguilliseptica* from winter disease outbreaks in sea bream *Sparus aurata*. *Dis. Aquat. Org.* **50**: 19-27.

Bradford, M.M. 1976. A rapid a sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

Brown, J.H. 1989. Antibiotics: Their use and abuse in Aquaculture. *World Aquaculture.* **20**: 34-43.

de Bruijn, F.J. 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and polimerase chain reactions to fingerprint the genomes of *Rhizobium melitoli* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2180-2187.

Buck, J.D. 1982. Non staining (KOH) method for determination of gram reactions of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 992-993.

Campbell, Mark S. & Wright, Anita C. 2003. Real-time PCR analysis of *Vibrio vulnificus* from oysters. *Appl. Envirom. Microbiol.* Pp: 7137-7144

Crosa, J.H. & Hodges, L.L. 1981. Outer membrane proteins induced under conditions of iron limitation in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* 775. *Infect. Immun.* **31**: 223-227.

Csaba, G., Prigli, M., Békési, L., Kovács-Gayer, E., Bajmöcy, E. & Fazekas, B. 1981. Septicaemia in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*, Val.) and bighead (*Aristichthys nobilis*, Rich.) caused by *Pseudomonas fluorescens*. Proceeding of the international Seminar of fish, Pathogens and Environment in European Polyculture. Szarvas. Hungría.

Cunningham, C. 2002. Molecular diagnosis of salmonid disease. Kluwer Academic Publishers. Doedrecht, The Netherlands.

Daly, J:G. 1999. Pseudomonas species. In: Woo, P.T.K., Bruno, D.W. (eds). *Fish diseases and disorders.* Vol 3. *Viral, bacterial and fungal infections.* Pp: 584-587. CABI Publishing, UK.

Daly, J.G. & Stevenson, R.M.W. 1987. Hydrophobic and hemagglutinating propierties of *Renibacterium salmoninarum*. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 3575-3580.

- Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N. & Ginsberg, H.S. (eds.)** 1981. Microbiology, including immunology and molecular genetics. 3^a ed. Pp. 552-572
- Dear, G.** 1985. studies on the biology, metabolism and pathogenicity of *Pseudomonas anguilliseptica*. Ph.D. Thesis. Heriot University, UK.
- Devesa, S., Barja, J:L. & Toranzo, A.E.** 1989. Ulcerative fin and skin lesions in reared turbot (*Scophthalmus maximus*). *J. Fish Dis.* **12**: 323-333.
- Dice, L. R.** 1945. Measures of amount of ecological association between species. *Ecology* **26**, 297.
- Doménech, A., Fernández-Garayzábal, J.F., Lawson, P., García, J.A., Cutili, M.T., Blanco, M., Gibello, A., Moreno, M.A., Collins, M.D. & Domínguez, L.** 1997. Winter disease outbreak in sea-bream (*Sparus aurata*) associated with *Pseudomonas anguilliseptica* infection. *Aquaculture* **156**: 317-326.
- Ellis, A.E., Dear, G. & Stewart, D.J.** 1983. Histopathology of Sekiten-byo caused by *Pseudomonas anguilliseptica* in the European eel, *Anguilla anguilla* L., in Scotland. *J. Fish. Dis.* **6**: 77-79.
- FAO.** 2004. El estado de la pesca mundial y la acuicultura. URL: <http://www.fao.org/documents>
- Finlay, B.B. & Falkow, S.** 1989. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol. Rev.* **53**: 210-230.
- Grisez, L.R. Ceuster & Ollivier, F.** 1991. The use of the API 20E for the identification of *Vibrio anguillarum* and *V. ordalii*. *J. Fish Dis.* **14**: 359-365.
- Haenen, O.L.M. & Davidse, A.** 1997. New problems with *Pseudomonas anguilliseptica* in Dutch eel cultura. VIIIth International Conference "Diseases of fish and shellfish". European Association of Fish Pathologists. Edinburgh, UK. P:43.
- Hatai, K., Egusa, S., Nakajima, M. & Chikahata, H.** 1975. *Pseudomonas chlororaphis* as a fish pathogen. *Bull. Japan. Soc. Scient. Fish.* **41**: 1203.
- Hiney, M. & Smith, P.** 1998. Validation of polymerase chain reaction-based detection techniques for bacterial pathogens in the environment: Framework, problems and possible solutions. *Aquaculture.* **162**: 41-68.
- Hitcock, P.J. & Brown, M.M.** 1983. Morphological heterogeneity among Salmonella lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Bacteriol.* **154**: 269-272.
- Hugh, R. & Leifson, E.** 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative of carbohydrate by various gram negative bacteria. *J. Bacteriol.* **66**:24

Bibliografia

Hulton, C.S.J., Higin, C.F. & Sharp, P.M. 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol. Microbiol.* **5**: 825-834.

Igarashi, A., Iida, T. & Crosa, J.H. 2002. Iron acquisition of *Edwardsiella tarda* with involvement in its virulence. *Fish. Pathol.* **37**: 53-57.

Inamura, H., Muroga, K. & Nakai, T. 1984. Toxicity of extracellular products of *Vibrio anguillarum*. *Fish Pathol.* **19**: 89-96.

Jacques, M., Kobisch, M., Bel anger, M. & Dugal, F. 1993. Virulence of capsulated and noncapsulated isolates of *Pasteurella multocida* and their adherence to porcine respiratory tract cells and mucuc. *Infect. Immun.* **61**: 4785-4792.

Janda, J.M., Abbot, S.L. & Osorio, L.S. 1991. Penetration and replication of *Edwardsiella* spp. in Hep-2 cells. *Infect. Immun.* **59**: 154-161.

Kado, C.I. & Liu, S.Y. 1981. Rapid procedure and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* **145**: 1365-1373.

Kent, M.L. 1982. Characteristic and identification of *Pasteurella* and *Vibrio* species pathogenic to fishes using API-20E (Analytab Products) multitube test strips. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **39**: 1725-1729.

Konkel, M.E. & Joens, L.A. 1989. Adhesion to and invasion of Hep-2 cells by *Edwardsiella tarda*. *Fish Pathol.* **25**: 237-241.

Kovacs, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyogenes* by the oxidase reactions. *Nature.* **178**: 703.

Kitao, T., 1993. Streptococcal infections. En-, Inglis, v., roberts, r.l., bromage, N.R. (eds.), *Bacterial Diseases of Fish. Black-well Scientific Publications, Oxford, UK*, pp:196-210.

Kuo, S.C. & Kou, G.H. 1978. *Pseudomonas anguilliseptica* isolated from red spot disease of pond-cultured eel, *Anguilla japonica*. *Rep.t Inst. Fish. Biol., Min. Econ. Aff. Nat. Taiwan Univ.* **3**: 19-23.

Kusuda, R., Dohata, N., Fukuda, Y. & Hawaii, K. 1995. *Pseudomonas anguilliseptica* infection of striped jack. *Fish Pathol.* **30**: 121-122.

Lannan, C.N., Bartholomew, J.L. & Fryer, J.L. 1999. Rickettsial and Chlamydial infections. In: Woo, P.T.K., Bruno, D.W. (eds.). *Fish diseases and disorders*. Vol.3. *Viral, bacterial and fungal infections*. Pp: 245-268. CABI Publishing, UK.

Lawson, M.A., Burke, V. & Chang, B.J. 1985. Invasion of Hep-2 cells by fecal isolates of *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.* **47**: 680-683.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavaje of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lemos, M.L., Mazoy, R., Conchas, R.F. & Toranzo, A.E. 1991. Presence of iron uptake mechanism in environmental non-pathogenic strains of *Vibrio anguillarum*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **11**: 150-152.

Linares, F., Olmedo, M., Ortega, A. & Peleteiro, J.B. (1999). Experiencias de engorde de besugo, *Pagellus bogaraveo* (Brünich, 1768) en jaulas y tanques de cultivo. 7º Congreso Nacional de Acuicultura. Las Palmas de Gran Canaria. P. 73

Liu, P.V. 1957. Survey of hemolysin production among spesies of *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.* **74**: 718-727.

Lönström, L., Wiklund, T. & Bylund, G. 1994. *Pseudomonas anguilliseptica* isolated from Baltic herring *Clupea harengus membras* with eye lesions. *Dis. Aquat. Org.* **18**: 143-147.

López-Romalde, S., Nuñez, S., Toranzo, A.E & Romalde, J.L. 2003. Black spot seabream (*Pagellus bogaraveo*), a new susceptible host for *Pseudomonas anguilliseptica*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* **23**: 258-264.

Magariños, B. 1991. Caracterización del patógeno de peces *Pasteurella piscicida*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Santiago de Compostela.

Magariños, B. 1995. *Pasteurella piscicida*: Aspectos taxonómicos, serológicos y de patogenicidad. Tesis doctoral. Facultad de Biología. Santiago de Compostela.

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., Romalde, J.L., Lemos, M.L., Barja, J.L. & Toranzo, A.E. 1994. Iron uptake by *Pasteurella piscicida* and its role in pathogenicity for fish. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2990-2998.

Magariños, B., Bonet, R., Romalde, J.L., Martínez, M:J., Congregado, F. & Toranzo, A.E. 1996. Influence of the capsular layer on the virulence of *Pasteurella piscicida* for fish. *Microb. Pathogen.* **21**: 289-297.

Magariños, B., Romalde, J.L., López-Romalde, S., Moriguiño, M.A. & Toranzo, A.E. 2003. Pathobiological characterization of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolated from cultured sole (*Solea senegalensis*). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **23**(4): 183.

MacFaddin, J.F. 1983. Biochemical test for identification of medical bacteria. 2nd ed. Williams & Wilkins, Baltimore. USA.

Bibliografia

Møllergaard, S. & Dalsgaard, I. 1986. Handbog I Alesygdomme. Dammarks fiskeri- og havundersøgelser. Rapport no. 293: 33-34.

Michel, C., Bernadet, J.F. & Dinand, D. 1992. Phenotypic and genotypic studies of *Pseudomonas anguilliseptica* strains isolated from farmed European eels (*Anguilla anguilla*) in France. *Gyobyō Kenkyū (Fish Pathol.)* **27**: 229-232.

Moeller, V. 1955. Simplified test for some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system. *Acta. Pathol. Microbiol. Scan.* **36**: 158.

Muroga, K. 1990. Bacterial infections in cultured fishes in Japan. In: Hirano, R., Hanyu, I. (eds.) The second Asian fisheries forum. *Asian Fisheries Society*. Pp:963-966.

Muroga, K., Jo, Y. & Sawada, T. 1975. Studies on red spot disease on pond-cultured eels. II. Pathogenicity of the causative bacterium, *Pseudomonas anguilliseptica*. *Fish Pathol.* **9**: 107-114.

Nakai, T. 1985. Resistance of *Pseudomonas anguilliseptica* to bactericidal action of fish serum. *Bull. Japan. Soc. Scient. Fish.* **45**: 817-821.

Nakai, T. & Muroga, K. 1979. Studies of red spot disease of pond-cultured eels. V. Immune response of the Japanese eel to the causative bacterium *Pseudomonas anguilliseptica*. *Bull. Japan. Soc. Scient. Fish* **45**: 817-821.

Nakai, T., Muroga, K. & Wakabayashi, H. 1981. Serological properties of *Pseudomonas anguilliseptica* antigens. *Bull. Japan. Soc. Scient. Fish* **47**: 699-703.

Nakai, T., Muroga, K. & Wakabayashi, H. 1982. An immunoelectrophoretic analysis of *Pseudomonas anguilliseptica* antigens. *Bull. Japan. Soc. Scient. Fish* **48**: 363-367.

Nakai, T., Hanada, H. & Muroga, K. 1985a. First records *Pseudomonas anguilliseptica* infection in cultured ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathol.* **20**: 481-484.

Nakai, T., Muroga, K., Chung, H.Y. & Kou, G.H. 1985b. A serological study on *Pseudomonas anguilliseptica* isolated from diseased eels in Taiwan. *Fish Pathol.* **19**: 259-261.

Nakai, T., Kanemori, Y., Nakajima, K. & Muroga, K. 1985c. The fate of *Pseudomonas anguilliseptica* in artificially infected eels *Anguilla japonica*. *Fish Pathol.* **19**: 253-258.

Nakayama, K., Muroga, K. & Hancock, R.E.W. 1983. Comparison of fatty acid, protein and serological properties distinguishing outer membranes of *Pseudomonas anguilliseptica* strains from those of fish pathogens and other pseudomonads. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**: 1-8.

Nogva, H.K. & Lillehaug, D. 1999. Detection and quantification of *Salmonella* in pure cultures using 5'-nuclease polymerase chain reaction. *Intern. J. Food Microbiol.* **51**: 191-196.

Nogva, H.K., Bergh, A., Holck, A. & Rudi, K. 2000. Application of the 5'-nuclease PCR assay in evaluation and development of methods for quantitative detection of *Campylobacter jejuni*. *App. Env. Microbiol.* **66**: 4029-4036..

Osorio, C.R., Collins, M.D., Toranzo, A.E., Barja, J.L. & Romalde, J.L. 1999. 16 rRNA genes 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.

Ofek, I. & Doyle, R.J. (eds.) 1994. *Bacterial adhesion to cells and tissues*. 1st ed. Chapman & Hall., New York, USA.

Otte, E. 1963. Die heutige Ansichten über die Ätiologie der Infektiösen Bachwassersucht der Karpfen. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* **50**: 995-1005.

Padrós, F., Hernández, A., Rotland, J., Puigcerver, M., Sala, R., Crespo, S., Tort, L., Ibarz, A., Sala, M., Gallardo, M.A., Blasco, J., Fernández, J. & Sánchez, J. 1995. La enfermedad de invierno en la dorada *Sparus aurata*. Características del síndrome, disfunciones observadas y metodología de análisis y prevención. VII Congreso Nacional de Acuicultura. Las Palmas de Gran Canaria, Spain. Pp: 169.

Padrós, F., Hernández, A., Rotland, J., Puigcerver, M., Sala, R., Crespo, S., Tort, L., Ibarz, A., Sala, M., Gallardo, M.A., Blasco, J., Fernández, J. & Sánchez, J. 1999. La enfermedad de invierno en dorada (*Sparus aurata* L.). características del síndrome, disfunciones observadas y metodología de análisis y prevención. VII Congreso Nacional de Acuicultura, Las Palmas de Gran Canaria, España.

Palleroni, N.J. 1984. Family *Pseudomonadaceae*. In: Krieg, N.R., Holt, J.G. (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Pp: 141-219. Williams & Wilkins, Baltimore. USA.

Pazos, F., Santos, Y., Núñez, S. & Toranzo, A.E. 1993. Increasing occurrence of *Flexibacter maritimus* in the marine aquaculture of Spain. *FHS Newsletter* **21**: 1-2.

Peleteiro, J.B., Olmedo, M., Gómez, C. & Álvarez-Blázquez, B. 1999. Evaluación de nuevas especies de peces potencialmente cultivables: besugo (*Pagellus bogaraveo*), salmonete (*Mullus surmuletus*), sargo (*Diplodus sargus*), mojarra (*Diplodus vulgaris*), abadejo (*Pocallus pocallus*), aligote (*Pagellus acarne*), en el NW de la península ibérica. 7º Congreso de Acuicultura. Las Palmas de Gran Canaria. p. 72.

Ravelo, C., Magariños, B., Toranzo, A.E. & Romalde, J.L. 2001. Conventional versus miniaturized systems for the phenotypic characterization of *Lactococcus garviaeae*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* **21**: 136-144.

Bibliografía

- Reed, L.J. & Muench, H.** 1983. A simple method of estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg.* **27**: 493-497.
- Robins-Browne, R.M., Tokhi, A.M., Adams, L.M., Bennett-Wood., Moisisis, A.V., Krejany, E.O. & O'Gorman, L.E.** 1994. Adherence characteristics of attaching and effacing strains of *Escherichia coli* from rabbits. *Infect. Immun.* **62**: 1584-1592.
- Roberts, R.J. & Horne, M.T.** 1978. Bacterial meningitis in farmed rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson affected with chronic pancreatic necrosis. *J. Fish Dis.* **1**: 157-164.
- Romalde, J.L.** 1992. *Yersinia ruckeri*: estudio epidemiológico y del mecanismo de virulencia. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- Romalde, J.L. & Magariños, B.** 1997 Immunization with bacterial antigens: Pasteurellosis. En: R. Gudding, A. Lillehaug, P.J. Midtlyng, and F. Brown (eds). *Fish Vaccinology*. Pp: 167-177. Ed. Karger. Basel. (Suiza)
- Romalde, J.L. & Toranzo, A.E.** 1991. Evaluation of the API-20E system for the routine diagnosis of the enteric redmouth disease. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* **11**: 147-149.
- Romalde, J.L. & Toranzo, A.E.** 1999. Streptococcosis of marine fish. En: Olivier, G (ed.). *ICES Identification Leaflets for Diseases and Parasities of Fish and Shellfish*. No **56**. International Council for the Exploitation of Sea. Copenhagen, Denmark. Pp: 1-8
- Romalde, J.L. & Toranzo, A.E.** 2002. Molecular approaches for the study and diagnosis of salmonid streptococcosis. En: *Molecular diagnosis of salmonid diseases*. Pp: 211-233. C. Cunningham (ed.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.
- Romalde, J.L., Lemos, M.L., Conchas, R.F., Bandín, I. & Toranzo, A.E.** 1990. Adhesive proprieties and other virulence factors in *Yersinia ruckeri*. En: Perkins, F.O & Chens, T. (eds). *Pathology in Marine aquaculture*. pp: 123-132. Academic Press. San Diego. USA.
- Romalde, J.L., Conchas, R.C. & Toranzo, A.E.** 1991. Evidences that *Yersinia ruckeri* possesses a high affinity iron uptake system. *FEMS Microbiol. Lett.* **80**: 121-126.
- Romalde, J.L., Magariños, B. & Toranzo, A.E.** 1999a. Prevention of streptococcosis in turbot by intraperitoneal vaccination. A review. *J. Appl. Ichthyol.* **15**: 153-158.
- Romalde, J.L., Magariños, B., Villar, C., Barja, J.L. & Toranzo, A.E.** 1999b. Genetic analysis of turbot pathogenic *Streptococcus parauberis* strains by ribotyping and random amplified polymorphic DNA. *FEMS. Microbiol. Lett.* **179**: 297-304.
- Romalde, J.L., Lores, F., Magariños, B., Barja, J.L. & Toranzo, A.E.** 2000. Study of cell surface associated virulence factors of *Streptococcus parauberis* strains pathogenic for turbot. *Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol.* **20**: 244-251.

Romalde, J.L., López-Romalde, S., Ravelo, C., Magariños, B. & Toranzo, A.E. 2003. Evidence of two clonal linajes within the emerging fish pathogen *Pseudomonas anguilliseptica* by serological and genetic techniques. *AFS/FHS Newsletter* **31**: 8-9

Romalde, J.L., Ravelo, C., López-Romalde, S., Avendaño, R., Magariños, B. & Toranzo, A.E. 2005. Vaccination strategies to prevent important emerging diseases for Spanish aquaculture. En: R. Gudding, A. Lillehaug, P.J. Midtlyng, and F. Brown (eds) *Fish Vaccinology*. Pp: 1. Ed. Karger. Basel. (Suiza).

Rosenberg, M. & Doyle, R.J. (eds.). 1990. Microbial Cell Hydrophobicity: History, Measurement, and Significance. *American Society for Microbiology. Washinton, USA*. pp: 1-37.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning. A laboratory annual. Cold Spring Harbor Laboratory press. Nueva York (USA).

Santos, Y., Toranzo, A.E., Dopazo, C.P., Nieto, T.P. & barja, J.L. 1987. Relationship among virulence for fish, enterotoxigenicity and phenotypic characteristics of motile *Aeromonas*. *Aquaculture*. **67**: 29-39.

Santos, Y., Lallier, R., Bandín, I., Lamas, J. & Toranzo, A.E. 1991. Susceptibility of turbot (*Scophthalmus maximus*), coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to the strains of *Vibrio anguillarum* and their exotoxins. *J. Appl. Ichthyol.* **7**: 160-167

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

Santos, Y., Pazos, F. & barja, J.L. 1999. *Flexibacter maritimus*, causal agent of flexibacteriosis in marine fish. ICES Identification Leaflets for Diseases and Parasites of Fish and Shellfish N° 55. International Council for the Exploration of the Sea. Denmark.

Shewan, J.M., Hobbs, G. & Hodgkiss, W. 1960. The Pseudomonas and Achromobacter groups of bacteria in the spoilage of marine white fish. *J. Appl. Bacteriol.* **23**: 463- 468.

Smith, H. 1984. The biochemical challenge of microbial pathogenicity. *J. Appl. Bacteriol.* **47**: 395-404.

Sørensen, U.B.S. & Larsen, J.L. 1986. Serotyping of *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 593-597.

Stern, M.J., Ames, G. F-L., Smith, N.H., Robinson, E.C. & Higgins, C.F. 1984. Repetitive extragenic palindromic sequences: a mayor component of the bacterial genome. *Cell.* **37**: 1015-1026.

Bibliografía

Stewart, D.J., Woldemariam, K., Dear & G., Mochaba, F.M. 1983. An outbreak of “Sekiten-byo” among cultured European eels, *Anguilla anguilla* L., in Scotland. *J. Fish Dis.* **6**: 75-76.

Thoesen, J.C. (ed.). 1994. Blue Book. Suggested Procedures for the Detection and Identification of Certain Fish and Shellfish Pathogens, Version 1. Fish Health Section, American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA.

Thornsberry, C. 1985. Automated procedures for antimicrobial susceptibility tests, En: Lennette, E. H., Balows, A., Hausler, Jr. W. J., & Shadomy, H. J. (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 4th ed. American Society for Microbiology, pp. 1015-1018. Washington, D.C.

Toranzo, A.E. & Barja, J.L. 1990. A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum* with special referente to aquaculture in the northwest of Spain. *Dis. Aquat. Org.* **9**: 73-82.

Toranzo, A.E. & Barja, J.L. 1993. Virulence factors of bacteria pathogenic for coldwater fish. *Ann. Rev. Fish Dis.* **3**: 5-36.

Toranzo, A.E., Barja, J.L., Colwell, R.R. & Hetrick, F.M. 1983a. Characterization of plasmids in bacterial fish pathogens. *Infect. Immun.*, **39**: 184-192.

Toranzo, A.E., Barja, J.L., Poter, R.R., Colwell, R.R., Hetrick, F.M. & Crosa, J.H. 1983b. Molecular factors associated with virulence of marine vibrios isolated from striped bass in Chesapeake Bay. *Infect. Immunol.* **39**: 1220-1227.

Toranzo, A.E., Barja, J.L., Colwell, R.R., Hetrick, F.M. & Crosa, J.H. 1983c. Haemagglutination, haemolytic and cytotoxic activities of *Vibrio anguillarum* and related vibrios isolated from striped bass on the Atlantic coast. *FEMS Microbiol. Lett.* **18**:257-262.

Toranzo, A.E., Baya, A., Roberson, B.S., Barja, J.L., Grimes, D.J. & Hetrick, F.M. 1987a. Specificity of slide agglutination test for detecting bacterial fish pathogens. *Aquaculture.* **61**: 81-97.

Toranzo, A.E., Santos, Y., Lemos, M.L., Ledo, A. & Bolinches, J. 1987b. Homology of *Vibrio anguillarum* causing epizootics in turbot, salmon and trout reared in the Atlantic coast of Spain. *Aquaculture.* **67**: 41-52.

Toranzo, A.E., Ledo, A., Santos, Y., Romalde, J.L., Bandín, I., Fouz, B. & Barja, J.L. 1989. Evolution of the bacterial fish diseases in trout, salmon and turbot cultured in northwest of Spain. *EAS Spec. Publ.* **10**: 247-248.

Toranzo, A.E., Santos, Y., Bandín, I., Romalde, J.L., Ledo, A., Fouz, B. & Barja, J.L. 1990. A five years survey of bacterial fish infections in continental and marine aquaculture in northwest of Spain. *World Aquaculture* **21**: 91-94.

Toranzo, A.E., Santos, Y., Núñez, S. & Barja, J.L. 1991. Biochemical and serological characteristics, drug resistance and plasmid profiles of Spanish isolates of *Aeromonas salmonicida*. *Fish Pathol.* **26**: 55-60.

Toranzo, A.E., Santos, Y. & Barja, J.L. 1997. Immunization with bacterial antigens: Vibrio infections. En: *Fish Vaccinology*. Pp: 93-106. R. Gudding, A. Lillehaug, P.J. Midtlyng, and F. Brown (eds) Ed. Karger. Basel. (Suiza).

Tort, L., Padrós, F., Rotllant, J. & Crespo, S. 1998a. Winter syndromes in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. Immunological and histopathological features. *Fish Shellfish Immunol.* **8**: 37-47.

Tort, L., Rotllant, J. & Rovira, L. 1998b. Immunological suppression in gilthead sea bream *Sparus aurata* of the North-West Mediterranean at low temperatures. *Com. Biochem. Physiol.* **120A**: 175-179.

Tort, L., Rotllant, J., Liarte, C., Acerete, L., Hernández, A., Ceulemans, S., Coutteau, P. & Padrós, F. 2004. Effects of temperature decrease on feeding rates, immune indicators and histopathological changes of gilthead sea bream *Sparus aurata* fed with an experimental diet. *Aquaculture.* **229**: 55-65.

Towbin, K., Staehelin, T & Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354.

Trust, T.J., Kay, W.W. & Ishiguro, E.E. 1993. Cell surface hydrophobicity and macrophage association of *Aeromonas salmonicida*. *Current. Microbiol.* **9**: 315-318.

Tsai, C.M. & Frasch, L.E. 1982. Staining of lipopolysaccharide in SDS polyacrylamide gels using silver-staining method. *Anal. Biochem.* **119**: 115-119.

Versalovic, J., Koeth, T. Lupski, J.R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic. Acids. Res.* **19**: 6823-6831.

Wishnubhatla, A., Fung, D.Y.C., Oberst, M.P., Hays, T., Nagaraja, T.G. & Flood, S.J.A. 2000. Rapid 5' nuclease (Taqman) assay for detection of virulent strains of *Yersinia enterocolitica*. *Appl. Env. Microbiol.* **66**: 4131-4135.

Wakabayashi, H. & Egusa, S. 1972. Characteristics of *Pseudomonas* sp. From an epizootic of pond-cultured eels (*Anguilla japonica*). *Bull. Japan. Soc. Fish.* **38**: 557-587.

Wiklund, T. & Dalsgaard, I. 1987. Disease outbreaks caused by *Pseudomonas anguilliseptica* in Finnish fish farms. In: Stenmark, A., Malmberg, G. (eds) Parasites and diseases in natural waters and aquaculture in Nordic countries. Swedish Museum of Natural History. Stockholm, p. 131.

Bibliografia

Wiklund, T. & Bylund, G. 1990. *Pseudomonas anguilliseptica* as a pathogen of salmonid fish in Finland. *Dis. Aquat. Org.* **8**: 13-19.