ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Ahmed

El Morabit Laser

Tesis doctoral

Caracterización de Aeromonas salmonicida ssp salmonicida y estudio de los mecanismos de interacción con el hospedador

Santiago de Compostela, 2022

PROGRAMA DE DOCTORADO EN AVANCES EN BIOLOXÍA MICROBIANA E PARASITARIA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

TESIS DE DOCTORADO

CARACTERIZACIÓN DE *Aeromonas salmonicida* ssp *salmonicida* Y ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE INTERACCIÓN CON EL HOSPEDADOR

Ahmed El Morabit Laser

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL DA UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN AVANCES EN BIOLOXÍA MICROBIANA E PARASITARIA

SANTIAGO DE

COMPOSTELA 2022

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

Caracterización de *Aeromonas salmonicida* ssp *salmonicida* y estudio de los mecanismos de interacción con el hospedador

D./Dª. María Ysabel Santos Rodríguez Y Rafael Seoane

Prado INFORMA/N:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D Ahmed El Morabit Laser, bajo nuestra dirección/tutorización, y autorizamos su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como directores de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

.

En Santiago de Compostela, 1 de septiembre de 2022

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DEL AUTOR/A DE LA TESIS

D./Dña. **Ahmed El Morabit Lasrer**

Título da tese: **Caracterización de *Aeromonas salmonicida* ssp *salmonicida* y estudio de los mecanismos de interacción con el hospedador**

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento y declaro que:

1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
3) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.
4) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide la versión impresa con la presentada en formato electrónico.

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso que el original no esté depositado en la Escuela.

En **Santiago de Compostela** 1 de septiembre **de 2022**.

Firma electrónica

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

El Trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido parcialmente financiado por un proyecto dentro del Programa “Acelerador de Transferencia” concedido por la Universidade de Santiago de Compostela y el Banco Santander.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Aspectos éticos

Todos los ensayos de experimentación con animales han sido realizados en el Animalario experimental de la Facultad de Biología de la Universidade de Santiago de Compostela (REGA ES150780263301), en el marco del proyecto de experimentación animal con autorización número 15004/16/004. En los estudios con animales de experimentación incluidos en esta tesis se han tenido en cuenta las consideraciones legales y técnicas recogidas en el R.D. 53/2013 del 1 de febrero, BOE nº 34, del 8 de febrero, en el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos. Los ensayos de experimentación animal han sido realizados por la Profesora Ysabel Santos Rodríguez, codirectora de la tesis**.**

Conflicto de interés

El doctorando no declara ningún conflicto de interés

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A mi esposa Nadia

A mis hijos Jamal, Lina, Salaheddine

A mis padres

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Agradecimientos

Con estas palabras me gustaría presentar mis agradecimientos a todos los que me han ayudado y apoyado en la realización de este trabajo:

En primer lugar, a mi directora y amiga la Dra. Ysabel Santos, que ha sido el auténtico motor de este trabajo desde el principio, con su continuo estímulo y esfuerzo en la realización de este, por la acertada orientación, el soporte y discusión crítica que me permitió un buen aprovechamiento en el trabajo realizado, y que esta tesis llegara a buen término, por su cariño y amistad y acogida desde mi llegada a Galicia.

Al Dr. Rafael Seoane, codirector de este trabajo, por su gran apoyo y colaboración en la parte de la citometría, por su paciencia y gran corazón. me honra tenerle como amigo.

A mis amigos y compañeros que nos une una amistad especial: Sonia, Gema, Nacho y Marta y Pedro en Galicia, Laura en Chile, Santi en Suiza, Cata en México les agradezco por el buen humor, amistad, por sus consejos, sin olvidar el gran apoyo y la fuerte amistad que nos une, a Cris que sufrió mucho conmigo en la parte de citometría con todas las disecciones, extracciones etc.., les agradezco a todos por su estímulo y ánimo en los momentos intensos que he pasado. A Yoli por su ayuda en la presentación de este trabajo.

A mi familia que me ha apoyado: en primer lugar, en memoria de mis padres Mohamed y Fátima, y mi hermano Jamal, que se han preocupado siempre por que terminara esta tesis; también a mis hermanos y hermanas por su cariño y la confianza que me han demostrado día tras día.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A mi esposa Nadia que me apoya siempre en todo, insistía siempre en terminar este trabajo con todas las dificultades que he tenido. A mis hijos, que me dan fuerza y optimismo para seguir adelante.

Por fin, a todos aquellos que no haya podido citar y me quedan en el tintero.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla de contenido

Agradecimientos ***7***

RESUMO ***13***

RESUMEN ***17***

ABSTRACT ***21***

1 INTRODUCCIÓN GENERAL 25

1.1. FURUNCULOSIS EN LA PISCICULTURA IBÉRICA ***25***

1.2. ASPECTOS TAXONÓMICOS DE AEROMONAS SALMONICIDA ***29***

1.3. FACTORES DE VIRULENCIA EN AEROMONAS SALMONICIDA ***33***

1.4. DIAGNÓSTICO, PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA FURUNCULOSIS ***40***

1.5. SISTEMA INMUNE DE LOS PECES ***44***

1.6. VACUNAS Y ESTRATEGIAS DE VACUNACIÓN EN ACUICULTURA ***54***

2. OBJETIVOS 61

3 ESTUDIO TAXONÓMICO Y VIRULENCIA DE *AEROMONAS SALMONICIDA* 67

3.1. MATERIALES Y MÉTODOS ***67***

3.1.1. Cepas bacterianas. Cultivo y conservación 67

3.1.2. Identificación de los aislados 67

3.1.3. Caracterización molecular de los aislados 78

3.1.4. Estudio de la virulencia y factores asociados 85

3.2. RESULTADOS ***88***

3.2.1. Caracterización taxonómica de las cepas estudiadas 88

3.2.2. Caracterización serológica 92

3.2.3. Caracterización molecular 92

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2.4. Virulencia y factores celulares y extracelulares 101

3.3. DISCUSIÓN ***..... 106***

4. DESARROLLO DE HERRAMIENTAS PARA EVALUAR LA RESPUESTA INMUNITARIA DEL RODABALLO .. 115

4.1. MATERIALES Y MÉTODOS ***..... 115***

4.1.1. Peces utilizados y condiciones de mantenimiento 115

4.1.2. Análisis del componente C3 del complemento 115

4.1.3. Optimización de un inmunoensayo doble indirecto 122

4.1.4 Identificación de antígenos inmunogénicos 126

4.2 RESULTADOS ***..... 131***

4.2.1. Purificación del componente C3 de rodaballo 131

4.2.2. Caracterización del componente C3 de rodaballo 135

4.2.3. Inmunoensayo enzimático para detección anticuerpos ... 136

4.2.4. Antígenos de *A. salmonicida* inmunogénicos para rodaballo 139

4.3. DISCUSIÓN ***..... 143***

5 EFECTO DE LA INFECCIÓN SOBRE PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS E INMUNOLÓGICOS DEL RODABALLO 151

5.1. MATERIALES Y MÉTODOS ***..... 151***

5.1.1. Cepas bacterianas y peces utilizados 151

5.1.2. Infección experimental y protocolo de muestreo 152

5.1.3. Obtención de la sangre y suero 153

5.1.4. **Determinación del hematocrito y hemoglobina** 153

5.1.5. Efecto de la infección sobre la respuesta inmune innata . 154

5.1.6. Análisis estadístico 158

5.2. RESULTADOS ***..... 159***

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.2.1. Infección experimental con *A. salmonicida* 159

5.2.2. Efecto de la infección sobre el hematocrito y nivel de hemoglobina..... 159

5.2.3. Estallido respiratorio de leucocitos de riñón 162

5.2.4. Estudio de la respuesta humoral innata..... 163

5.3. DISCUSIÓN*..... *165

6 VACUNACIÓN: EFECTO DE LA VACUNA Y VÍA DE ADMINISTRACIÓN..... 173

6.1. MATERIALES Y MÉTODOS*..... *173

6.1.1. Peces utilizados y condiciones de mantenimiento 173

6.1.2. Vacunas utilizadas..... 173

6.1.3. Procedimientos de vacunación..... 174

6.1.4. Eficacia de la vacunación 178

6.1.5. Respuesta inmunitaria específica..... 179

6.2. RESULTADOS* *180

6.2.1. **Eficacia de la vacunación: ensayos de laboratorio** 180

6.2.2. Eficacia de la vacunación: ensayos de campo 186

6.3. DISCUSIÓN*..... *187

7 VACUNACIÓN: EFECTO SOBRE EL HEMATOCRITO Y RESPUESTA INMUNITARIA 193

7.1. MATERIALES Y MÉTODOS*..... *193

7.1.1. Producción de autovacunas y evaluación de su eficacia .. 193

7.1.2. Recolección de muestras 194

7.1.3. Análisis del hematocrito y de la respuesta inmune..... 195

7.1.4. Análisis estadístico..... 195

7.2. RESULTADOS* *196

7.2.1. Eficacia de las autovacunas anti- furunculosis..... 196

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7.2.2. Efecto de la vacunación en el hematocrito 197

7.2.3. Efecto de la vacunación en la respuesta inmune innata .. 198

7.3. DISCUSIÓN..... 203

8 DISCUSIÓN GENERAL 209

9 CONCLUSIONES 219

10 BIBLIOGRAFÍA..... 223

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

RESUMO

A acuicultura é actualmente a industria de produción de alimentos de máis rápido crecemento no mundo debido á crecente demanda de consumo de peixe para alimentación. Con todo, o cultivo intensivo de peces comestibles deu lugar a brotes de diversas enfermidades bacterianas, o que provocou cuantiosas perdas económicas á industria acuícola a nivel mundial.

Entre as principais enfermidades bacterianas que afectan os peixes cultivados en augas continentais e mariñas da península Ibérica, atópase a furunculosis típica causada por *Aeromonas salmonicida* subespecie *salmonicida*.

A furunculosis é unha enfermidade cunha ampla distribución xeográfica e foi descrita como causa de mortalidade en peixes salmónidos e non salmónidos a nivel mundial. En España, *Aeromonas salmonicida*, foi detectada tanto en poboacións salvaxes de troita e salmón como en peixes cultivados industrialmente. A partir de 1990, *A. salmonicida* foi illada como un axente causal de mortalidades en rodaballo e linguado cultivado en Galicia e Portugal, en dourada (*Sparus aurata*) cultivada en Canarias e de robaliza (*Dicentrarchus labrax*) cultivada na área Mediterránea.

A furunculosis é unha enfermidade sistémica que cursa xeralmente como unha septicemia hemorráxica de curso agudo ou crónico. Os principais signos en peixes afectados de furunculosis crónica inclúen hemorraxias na base das aletas, abdome e perianais, nódulos e úlceras cutáneas. No rodaballo obsérvanse úlceras sobre os tubérculos óseos. A aparición destes signos clínicos fai que se reduza o valor comercial do peixe ou imposibilita a súa venda co consecuente prexuízo económico. Internamente obsérvase ascitis, hemorraxia en fígado e vexiga

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

natatoria, esplenomegalia. Os peixes afectados pola forma aguda poden morrer sen ningún destes signos clínicos. A morte do peixe adóitase producir por un choque hipoglucémico como consecuencia da utilización da glicosa sanguínea polo patóxeno no seu proceso de multiplicación.

Do mesmo xeito que na produción de animais terrestres, os antibióticos tamén se utilizan na acuicultura para tentar controlar as enfermidades bacterianas. Con todo, o uso continuado e abusivo destes fármacos favoreceu a rápida aparición e diseminación de resistencias, o que fai que se requiran doses máis altas para un control eficaz, un asunto que preocupa cada vez máis ao público. Por tanto, necesítanse de xeito urxente alternativas aos antibióticos que ofrezan unha protección similar ou maior aos animais acuáticos. Co fin de resolver este grave problema desenvolvéronse vacinas para combater as enfermidades bacterianas na acuicultura. Con todo, ata o momento non se desenvolveron vacinas e estratexias de prevención eficaces fronte á furunculosis que afecta o rodaballo. Por outra banda, o deseño de métodos de prevención baseados na inmunización require a identificación dos antíxenos inmunoxénicos para peixes e o desenvolvemento de ferramentas eficaces para detectar a resposta do sistema inmune dos peixes fronte ao patógeno e os seus antígenos.

O presente estudo centrouse na caracterización e estudo da virulencia de cepas de *A. salmonicida* illadas de rodaballo e outras especies de peixes salmónidos e non salmónidos, o desenvolvemento de ferramentas e optimización de técnicas serolóxicas para o estudo da resposta inmune do rodaballo fronte á infección e a vacinación e na procura de vacinas e procedementos de inmunización eficaces na protección do rodaballo fronte á furunculosis. Os resultados obtidos han permitido identificar a *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* como o principal axente causal de furunculosis en España e Portugal.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Ademais, realizouse a caracterización parcial e obtívose un anticorpo fronte ao compoñente C3 do complemento do rodaballo, optimizouse unha técnica de ELISA dobre indirecto para a detección de anticorpos específicos fronte a *A. salmonicida* no soro de rodaballo e púxose a punto unha técnica para a caracterización de antíxenos inmunoxénicos para peixes utilizando liñas de cultivo celular. Por último, avaliouse a eficacia de vacinas comerciais e autovacunas de base acuosa e oleosa e de diferentes protocolos de inmunización para a prevención da furunculosis en rodaballo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

RESUMEN

La acuicultura es actualmente la industria de producción de alimentos de más rápido crecimiento en el mundo debido a la creciente demanda de consumo de pescado para alimentación. Sin embargo, el cultivo intensivo de peces comestibles ha dado lugar a brotes de diversas enfermedades bacterianas, lo que ha provocado cuantiosas pérdidas económicas a la industria acuícola a nivel mundial.

Entre las principales enfermedades bacterianas que afectan a los peces cultivados en aguas continentales y marinas de la península Ibérica, se encuentra la furunculosis típica causada por *Aeromonas salmonicida* subespecie *salmonicida*. La furunculosis es una enfermedad con una amplia distribución geográfica y ha sido descrita como causa de mortalidad en peces salmónidos y no salmónidos a nivel mundial. En España, *Aeromonas salmonicida,* ha sido detectada tanto en poblaciones salvajes de trucha y salmón como en peces cultivados industrialmente. A partir de 1990, *A. salmonicida* ha sido aislada como un agente causal de mortalidades en rodaballo y lenguado cultivado en Galicia y Portugal, en dorada (*Sparus aurata*) cultivada en Canarias y de lubina (*Dicentrarchus labrax*) cultivada en el área Mediterránea.

La furunculosis es una enfermedad sistémica que cursa generalmente como una septicemia hemorrágica de curso agudo o crónico. Los principales signos en peces afectados de furunculosis crónica incluyen hemorragias en la base de las aletas, abdomen y perianales, nódulos y úlceras cutáneas. En el rodaballo se observan úlceras sobre los tubérculos óseos. La aparición de estos signos clínicos hace que se reduzca el valor comercial del pescado o imposibilita su venta con el consiguiente perjuicio económico. Internamente se observa ascitis, hemorragia en hígado y vejiga natatoria, esplenomegalia. Los peces afectados por la forma aguda pueden morir sin ninguno de estos signos clínicos. La muerte del pez se suele producir por un

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

choquehipoglucémico a consecuencia de la utilización de la glucosa sanguínea por el patógeno en su proceso de multiplicación.

Al igual que en la producción de animales terrestres, los antibióticos también se utilizan en la acuicultura para intentar controlar las enfermedades bacterianas. Sin embargo, el uso continuado y abusivo de estos fármacos ha favorecido la rápida aparición y diseminación de resistencias, lo que hace que se requieran dosis más altas para un control eficaz, un asunto que preocupa cada vez más al público. Por lo tanto, se necesitan urgentemente alternativas a los antibióticos que ofrezcan una protección similar o mayor a los animales acuáticos. Con el fin de solventar este grave problema se han desarrollado vacunas para combatir las enfermedades bacterianas en la acuicultura. Sin embargo, hasta el momento no se han desarrollado vacunas y estrategias de prevención eficaces frente a la furunculosis que afecta al rodaballo. Por otra parte, el diseño de métodos de prevención basados en la inmunización requiere la identificación de los antígenos inmunogénicos para peces y el desarrollo de herramientas eficaces para detectar la respuesta del sistema inmune de los peces frente al patógeno y sus antígenos.

El presente estudio se ha centrado en la caracterización y estudio de la virulencia de cepas de *A. salmonicida* aisladas de rodaballo y otras especies de peces salmónidos y no salmónidos, el desarrollo de herramientas y optimización de técnicas serológicas para el estudio de la respuesta inmune del rodaballo frente a la infección y la vacunación y en la búsqueda de vacunas y procedimientos de inmunización eficaces en la protección del rodaballo frente a la furunculosis. Los resultados obtenidos han permitido identificar a *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* como el principal agente causal de furunculosis en España y Portugal. Además, se ha realizado la caracterización parcial y se ha obtenido un antisuero frente al componente C3 del complemento del rodaballo, se ha optimizado una técnica de ELISA doble indirecto para

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

la detección de anticuerpos específicos frente a *A. salmonicida* en el suero de rodaballo y se ha puesto a punto una técnica para la caracterización de antígenos inmunogénicos para peces utilizando líneas de cultivo celular. Por último, se ha evaluado la eficacia de vacunas comerciales y autovacunas de base acuosa y oleosa y de diferentes protocolos de inmunización para la prevención de la furunculosis en rodaballo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ABSTRACT

Aquaculture is currently the fastest growing food production industry in the world due to the increasing demand for food fish consumption. However, intensive farming of edible fish has led to outbreaks of various bacterial diseases, resulting in heavy economic losses to the aquaculture industry worldwide.

Among the main bacterial diseases affecting farmed fish in inland and marine waters of the Iberian Peninsula is the typical furunculosis caused by *Aeromonas salmonicid*a subspecies *salmonicida*. Furunculosis is a disease with a wide geographical distribution and has been described as a cause of mortality in salmonid and non-salmonid fish worldwide. In Spain, *Aeromonas salmonicida* has been detected in wild trout and salmon populations as well as in industrially farmed fish. Since 1990, *A. salmonicida* has been isolated as a causative agent of mortalities in turbot and sole farmed in Galicia and Portugal, in sea bream (*Sparus aurata*) farmed in the Canary Islands and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) farmed in the Mediterranean area.

Furunculosis is a systemic disease that usually presents as a haemorrhagic septicaemia of acute or chronic course. The main signs in fish affected by chronic furunculosis include haemorrhages at the base of the fins, abdomen and perianal, skin nodules and ulcers. In turbot, ulcers are observed on the bony tubercles. The appearance of these clinical signs reduces the commercial value of the fish or makes it unsaleable with consequent economic damage. Internally, ascites, haemorrhage in liver and swim bladder, splenomegaly is observed. Fish affected by the acute form may die without any of these clinical signs. Death of the fish is usually caused by hypoglycaemic shock because of the pathogen's use of blood glucose in its multiplication process.

As in terrestrial animal production, antibiotics are also used in

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

aquaculture to try to control bacterial diseases. However, the continued and abusive use of these drugs has favoured the rapid emergence and spread of resistance, resulting in higher doses being required for effective control, an issue of increasing public concern. Therefore, alternatives to antibiotics that offer similar or greater protection to aquatic animals are urgently needed. To address this serious problem, vaccines have been developed to combat bacterial diseases in aquaculture. However, effective vaccines and prevention strategies against furunculosis in turbot have not been developed so far. Moreover, the design of immunisation-based prevention methods requires the identification of immunogenic antigens for fish and the development of effective tools to detect the response of the fish immune system to the pathogen and its antigens.

The present study has focused on the characterisation and study of the virulence of *A. salmonicida* strains isolated from turbot and other salmonid and non-salmonid fish species, the development of tools and optimisation of serological techniques for the study of the immune response of turbot to infection and vaccination and the search for vaccines and immunisation procedures effective in protecting turbot against furunculosis. The results obtained have allowed the identification of *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* as the main causal agent of furunculosis in Spain and Portugal. In addition, partial characterisation has been carried out and a polyclonal antiserum against the C3 component of turbot complement has been obtained, a double indirect ELISA technique for the detection of specific antibodies against *A. salmonicida* in turbot serum has been optimised and a technique for the characterisation of immunogenic antigens for fish using cell culture lines has been developed. Finally, the efficacy of commercial vaccines and autovaccines based on aqueous and oily vaccines and of different immunisation protocols for the prevention of furunculosis in turbot has been evaluated.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. FURUNCULOSIS EN LA PISCICULTURA IBÉRICA

En las últimas décadas se ha multiplicado a nivel mundial la demanda de pescado como fuente saludable de nutrientes. El aporte de pescado procedente de la pesca extractiva (93,6 toneladas) es insuficiente para cubrir los requerimientos mundiales (Apromar, 2021). Es por lo que la producción de acuicultura seguirá siendo imprescindible para dar respuesta a la creciente demanda de productos acuáticos sanos y nutritivos.

Desde los años 80 la acuicultura española ha dado un gran salto, desarrollando los cultivos costeros con ciertas variedades de especies marinas como la dorada (*Sparus aurata*) y la lubina (*Dicentrarchus labra*x) en Canarias, Comunidad Valenciana, Andalucía, y Cataluña, el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) y el lenguado (*Solea senegalensis*) en las costas de Galicia, la corvina (*Argyrosomus regius*) en la Comunidad Valenciana, Murcia y Andalucía y el atún rojo (*Thunnus thynnus*) en el área mediterránea. El cultivo de seriola (*Seriola dumerili*) o pez limón se está incorporando actualmente a la producción acuícola a escala comercial en Andalucía, Canarias y la Comunidad Valenciana (Apromar, 2021). En la acuicultura continental la principal especie producida es la trucha arco iris *(Oncorhynchus mykiss*), siendo las principales regiones productoras Castilla y León, Galicia, Andalucía, Cataluña, La Rioja, Castilla la Mancha, Asturias y Aragón. También se producen en menor proporción varias especies de esturiones (*Acipenser baerii* y *Acipenser naccarii*) en Granada y la tenca (*Tinca tinca*) en la comunidad autónoma de Extremadura y Castilla y León (Apromar, 2021). A pesar de los grandes logros conseguidos con los cultivos marinos y de agua dulce, la acuicultura se sigue enfrentando a una serie

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de problemas que afectan su rentabilidad, siendo uno de los principales las enfermedades infecciosas causadas fundamentalmente por bacterias.

Entre las principales enfermedades bacterianas que afectan a los peces cultivados en aguas continentales y marinas de la península Ibérica, se encuentra la furunculosis típica causada por *Aeromonas salmonicida* subespecie *salmonicida* (Toranzo y col, 2005). Esta enfermedad tiene una amplia distribución geográfica y ha sido descrita en Estados Unidos, Canadá, Sudáfrica, Japón y Europa como causa de mortalidad, fundamentalmente, en peces salmónidos (Austin y Austin, 2016; Bruno, 2015). En España, *Aeromonas salmonicida,* ha sido detectada tanto en poblaciones salvajes de trucha y salmón como en peces cultivados industrialmente (Toranzo y col, 2005). A partir de 1990, *A. salmonicida* ha sido aislada como un agente causal de mortalidades en rodaballo y lenguado cultivado en Galicia y Portugal (Magariños y col, 2011; Toranzo y col, 2005), así como de alevines y adultos de dorada (*Sparus aurata*) cultivada en Canarias (Real y col., 1994) y de lubina (*Dicentrarchus labrax*) cultivada en el área Mediterránea (Fernández-Álvarez y col, 2016a).

La furunculosis es una enfermedad sistémica que cursa generalmente como una septicemia hemorrágica de curso agudo o crónico. Los principales signos en peces afectados de furunculosis crónica incluyen hemorragias en la base de las aletas, abdomen y perianales, nódulos y úlceras cutáneas. En el rodaballo se observan úlceras sobre los tubérculos óseos (Figura 1). Internamente se observa ascitis, hemorragia en hígado y vejiga natatoria, esplenomegalia. Los peces afectados por la forma aguda pueden morir sin ninguno de estos signos clínicos (Austin y Austin, 2016, Bruno, 2015; Buller, 2014). La muerte del pez se suele producir por un choque hipoglicémico a consecuencia de la utilización de la glucosa sanguínea por el patógeno en su proceso de multiplicación (Austin y Austin, 2016).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En la actualidad se han descrito dos formas de furunculosis la típica causada por *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* y la forma atípica causada por diferentes subespecies de *A. salmonicida* (Figura 2).

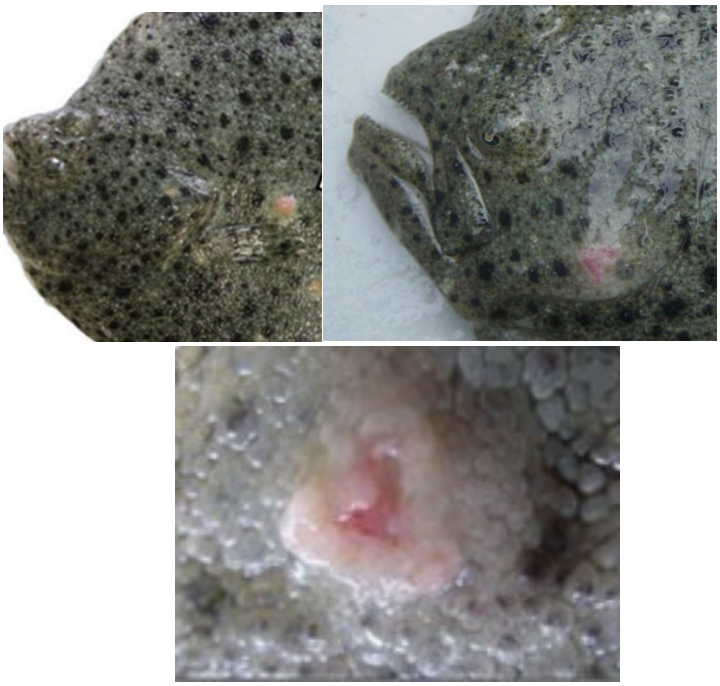


Figura 1. Signos de furunculosis en rodaballos cultivados. Imagen elaborada por el autor de la Tesis.

Aeromonas salmonicida ssp. *salmonicida*, el agente etiológico de la furunculosis típica fue aislado por primera vez a partir del furúnculo de una trucha cultivada en el norte de Alemania y se le denominó como "Bacilo de la enfermedad contagiosa de la trucha" (Austin y Austin, 2016). Hasta 1953, fecha en la que Griffin y col. (1953) proponen su inclusión en el género

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Aeromonas, la bacteria fue descrita bajo el término de *Bacillus salmonicida*.

Desde su primera descripción como patógeno de peces, la especie *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*, ha sido descrita por varios investigadores como el agente causante de furunculosis en distintas especies de peces salmónidos y no salmónidos (Austin y Austin, 2016; Bruno, 2015).

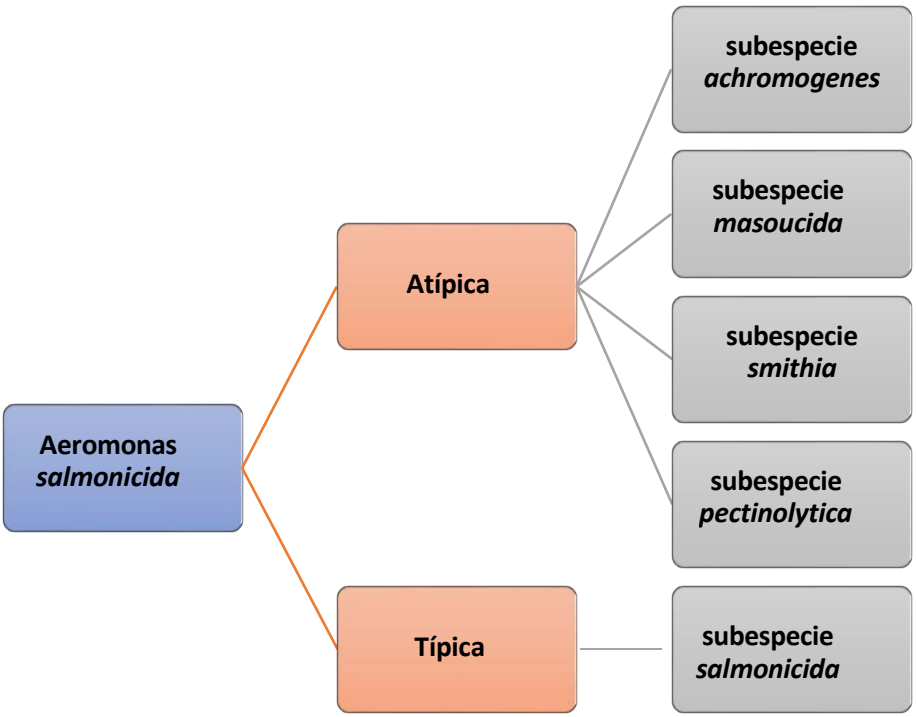


Figura 2. Subespecies de A. salmonicida causantes de furunculosis típica y atípica. Imagen elaborada por el autor de la Tesis.

La especie *Aeromonas salmonicida* y sus subespecies se encuentran ampliamente distribuidas por todo el mundo (Austin y Austin, 2016, Bruno, 2015, Buller, 2014). Los brotes de furunculosis

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

son provocados por factores estresantes interrelacionados, como son el aumento de la temperatura del agua en la primavera o durante períodos de cambio rápido de temperatura, manejo incluyendo fecundación y desove, hacinamiento y mala calidad del agua.

1.2. ASPECTOS TAXONÓMICOS DE AEROMONAS SALMONICIDA

La posición taxonómica de *Aeromonas salmonicida* ha sido revisada por diferentes autores (Austin y Austin,2016, Bruno, 2015; Buller, 2014).

El género *Aeromonas* fue incluido en un principio en la Familia *Vibrionaceae* con dos divisiones principales: el grupo de bacterias mesófilas móviles en el que se contemplaban tres especies denominadas *Aeromonas hydrophila, A. sobria* y *A. caviae* y el grupo de bacterias psicrófilas e inmóviles constituido por la especie *Aeromonas salmonicida*. Posteriormente, se dividió la especie *A. salmonicida* en tres subespecies: *salmonicida,* que incluye las cepas típicas productoras de pigmento difusible y las subespecies *achromogenes* y *masoucida* que incluyen cepas atípicas. Sin embargo, estudios genéticos posteriores sugirieron que la clasificación en subespecies es innecesaria (Austin y Austin, 2016, Bruno, 2015; Buller, 2014) proponiéndose otra clasificación basada en criterios epizotiológicos:

Grupo 1: *A. salmonicida* ssp. *salmonicida*. Incluye cepas aisladas de peces salmónidos.

Grupo 2: *A. salmonicida* ssp. *achromogenes*. Incluye cepas atípicas aisladas de peces salmónidos y anteriormente designadas como subespecies *achromogenes* y *masoucida*.

Grupo 3: *A. salmonicida* ssp. *nova*. Incluye cepas atípicas aisladas

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de peces no salmónidos.

Posteriormente, Colwell y col. (1986) proponen la inclusión del género *Aeromonas* en la nueva Familia *Aeromonadaceae*. En la novena edición del Manual Bergey, Holt y col. (1994) dividen la especie en cuatro subespecies denominadas como *A. salmonicida* ssp. *salmonicida*, *A. salmonicida* ssp. *achromogenes*, *A. salmonicida* ssp. *masoucida* y *A. salmonicida* ssp. *smithia* en base a estudios de taxonomía numérica e hibridación de ácidos nucleicos (Tabla 1). Aunque los estudios fenotípicos y genotípicos (Austin y col., 1989; Cipriano y Bullock, 2001; Cipriano y Austin, 2011; Austin y Austin, 2016) indican que las cepas de *A. salmonicida* ssp. *salmonicida* forman un grupo clonal homogéneo, existe una mayor variabilidad entre las cepas atípicas de la especie. De hecho, la subdivisión en base a los análisis genotípicos y moleculares no siempre está correlacionada con la subdivisión en subespecies basada en los estudios fenotípicos. Así, la secuenciación y análisis de las regiones variables del rRNA 16S (Barry y col., 1990; Martínez-Murcia y col., 1992) han demostrado que las subespecies *masoucida* y *achromogenes* son indistinguibles entre sí y diferentes de la subespecie *salmonicida*.

En el año 2000 Pavan y col. propusieron una nueva subespecie "*pectinolytica*" en base a estudios fenotípicos y de hibridación DNA-DNA de cepas aisladas de aguas contaminadas en Argentina. Estas cepas presentaban características diferenciales con respecto a la especie *salmonicida* como son la capacidad para fermentar el sorbitol o la capacidad para crecer a 37ºC. La comparación de las secuencias del ARNr 16S indican que estos aislados constituyen un grupo homogéneo con una estrecha relación con las subespecies *salmonicida*, *masoucida* y *achromogenes*.

Las características fenotípicas de la especie *A. salmonicida* ssp. *salmonicida* son: bacilo inmóvil Gramnegativo, aeróbico facultativo, de talla de 1,3-2,0 y 0,8-1,3µm. La bacteria crece en un rango de temperaturas comprendido entre 4ºC y 28 ºC pero la temperatura óptima

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de crecimiento es 22ºC, también puede crecer a concentraciones de sal que van desde el 0% al 3%.

Aunque la producción de un pigmento marrón difusible en el medio de cultivo se ha descrito como característica diferencial de este microorganismo, existen cepas atípicas productoras de pigmento y se ha descrito la existencia de variantes no pigmentadas como consecuencia del subcultivo. Además, la producción de pigmento está inhibida y/o retardada en condiciones anaeróbicas, en medios que contienen azúcares fermentables (0,15% peso/volumen) o cuando se incuban los cultivos a temperaturas próximas a 22ºC (Austin y Austin, 2016; Buller, 2014). En la Tabla 1 se muestran las características fisiológicas y bioquímicas que permiten diferenciar *A. salmonicida* ssp. *salmonicida* de las otras subespecies.

A nivel serológico, *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida,* constituye un grupo homogéneo. Además, se ha demostrado que la capa A y los lipopolisacáridos, que son los principales componentes inmunogénicos de la membrana externa de *A. salmonicida*, son estructural e inmunológicamente similares (Austin y Austin, 2016; Buller, 2014; Cipriano y Bullock, 2001; Cipriano y Austin, 2011; Ellis, 1997). Se ha descrito la producción de un polisacárido capsular dispuesto externamente a la capa A cuando las cepas crecen “in vivo” o cuando crecen “in vitro” en medios enriquecidos con glucosa. La naturaleza homogénea de esta subespecie ha sido también demostrada mediante ensayos de hibridación DNA-DNA, ribotipado, análisis del polimorfismo genómico (RAPD), análisis plasmídico y electroforesis en campos pulsantes (Toranzo y col., 1991; Miyata y col., 1995; Livesley y col., 1999)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 1. Características diferenciales de las diferentes subespecies de Aeromonas salmonicida (Holt y col., 1994) y Pavan y col. (2000).

Características	*Aeromonas salmonicida* ssp.				
	salmonicida	***achromogenes***	***masoucida***	***smithia***	***pectinolytica***
Produción de indol	–	+	+	–	+
Rojo metilo	+	+	+	–	ND
Voges-proskauer	–	–	+	–	+
Citrato de Simmons	–	–	–	–	+
Produción H_2S	–	–	+	+	–
Lisina decarboxilasa	V	V	V	–	–
Arginina dehidrolasa	+	+	+	V–	V–
Gas de D-Glucosa	+	–	+	V+	+
Producción de ácido de:					
D-Glucosa	+	+	+	V+	+
L-Arabinosa	+	–	+	ND	+
D-Galactosa	+	+	+	–	ND
Glicerol	V	V	V	V–	ND
D-Manitol	+	-	+	V–	ND
D-Manosa,	+	+	+	V–	+
Maltosa	+	+	+	–	ND
D-Sorbitol	–	–	–	V–	+
Sacarosa	–	+	+	V	+
Trealosa	+	+	+	–	+
Hidrólisis de					
Esculina	+	–	+	–	–
Lipasa	+	+	+	–	ND
ONPG	V	V	V	+	+
Pigmento marrón difusible	+	–	–	–	+

+ = ≥90% de las cepas positivas; – = ≥90% de las cepas negativas; V– = 0-10% de las cepas positivas; V+ = 76-89% de las cepas son positivas; ND = No descrito.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.3. FACTORES DE VIRULENCIA EN *AEROMONAS SALMONICIDA*

La patogenicidad, una de las propiedades más llamativa de los microorganismos, ha sido desde siempre objeto de estudio por parte de los microbiólogos con el fin de conocer las bases fisiológicas y bioquímicas de las enfermedades infecciosas y desarrollar las medidas preventivas y terapéuticas necesarias. Un microorganismo patógeno debe ser capaz de alcanzar los tejidos del hospedador, multiplicarse y resistir los mecanismos de defensa específicos e inespecíficos antes de causar un perjuicio.

En los últimos años se han descrito una serie de potenciales factores de virulencia en *A. salmonicida* que, de forma individual o colectivamente, pueden contribuir a satisfacer estos criterios de patogenicidad.

Algunos de estos factores están asociados a la superficie celular de la bacteria mientras que otros son extracelulares (Figura 3).

Factores asociados a la superficie celular

Durante mucho tiempo se ha aceptado la existencia de relación entre virulencia y la posesión de una envuelta proteica denominada capa A ("A Layer") debido a que las cepas que carecían de esta capa (cepas A-) eran avirulentas (Figura3). Esta capa, compuesta por una proteína de 49-50 kDa, está presente tanto en cepas típicas como atípicas de la especie. Estudios comparativos de cepas virulentas (A+) y avirulentas (A-) han demostrado que las cepas A+ poseen una serie de características diferenciales que están ausentes en las cepas A- como son: la producción de colonias adherentes, la auto agregación, la adherencia a células y la hemaglutinación de eritrocitos de peces, la capacidad de unir los colorantes Rojo Congo y Azul Coomassie, la hidrofobicidad de la superficie celular, la resistencia a la actividad

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

bactericida del suero y a la degradación por enzimas proteolíticos. (Austin y Austin, 2016, Bruno, 2015, Buller, 2014).

Debido a ello, algunas de estas características han sido con frecuencia utilizadas como marcadores de virulencia o para predecir la presencia de capa A en las cepas. Sin embargo, el concepto de virulencia ligado a la posesión de capa A ha sido cuestionado debido a que se han encontrado algunas cepas con características inusuales como: cepas A- capaces de auto agregar, cepas A- que son virulentas (Ward y col., 1985; Adams y col., 1988) y cepas A+ que son avirulentas (Adams y col., 1988; Cipriano y Blanch, 1989). En conclusión, ninguno de los ensayos "in vitro" utilizados normalmente para predecir la presencia de capa A pueden ser utilizados para predecir la virulencia de las cepas de *A. salmonicida*.

Por otra parte, se ha demostrado que la envoltura celular de *A. salmonicida* está compuesta básicamente por la capa A intercalada entre las subunidades repetitivas que constituyen el "antígeno O" del LPS bacteriano (Figura 3). Los estudios realizados por Cipriano y Blanch (1989) demostraron que las cepas avirulentas que poseen la capa A carece del "antígeno O" (Fenotipo A+ LPS-), concluyendo que las diferencias en la composición del LPS de la envoltura celular actúan de forma sinérgica con la capa A incrementando la patogenicidad.

Los estudios descritos hasta el momento son el resultado de experimentos llevados a cabo con bacterias cultivadas en medios inertes en el laboratorio. Sin embargo, la mayoría de los investigadores están de acuerdo en que estas condiciones no reflejan necesariamente las que el patógeno encuentra en el interior del pez. Con el fin de solventar este problema, algunos científicos han tratado de investigar lo que ocurría cuando la bacteria crecía "in vivo" (Garduño y col., 1993; Thornton y col., 1993) mediante la implantación en el peritoneo de los peces de cámaras de difusión que contenían células de *A. salmonicida*.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Este tipo de ensayos permitió demostrar que las células crecidas "in vivo" presentaban un material polisacarídico que rodeaba completamente la capa A y confería a las células resistencia a la actividad fagocítica y bacteriolítica del hospedador (Karczewski y col., 1991). El análisis de este material demostró que era inmunológicamente similar al material capsular que parece observarse cuando las cepas de *A. salmonicida* crecen en un medio rico en glucosa (Garrote y col., 1992).

Estudios posteriores en los que se fraccionó y se analizó el material polisacarídico demostraron la presencia de un tipo de LPS, sugiriendo, pero no probando, que el polisacárido extracelular detectado podría ser un LPS modificado en el interior del hospedador.

En 1995, Garduño y Kay comparando células crecidas "in vivo" con células crecidas "in vitro", concluyeron que no existe parecido entre ambas ni en composición ni en función. Aunque es conocido que *Aeromonas salmonicida* puede sobrevivir dentro de los macrófagos, aún no se ha esclarecido el mecanismo bacteriano que lo favorece. Se ha sugerido que ciertos factores de virulencia, como la capa A y diversos efectores del sistema de secreción tipo III (Figura 3) bloquean los mecanismos bactericidas permitiendo la supervivencia intracelular (Burr y col., 2005; Dacanay y col., 2006; Fast y col., 2009; Vanden Bergh y Frey, 2013).

Factores extracelulares

Entre los factores extracelulares que han sido descritos como asociados con la virulencia de *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*, se incluyen hemolisinas, proteasas; fosfolipasas, así como actividades citotóxicas (Austin y Austin, 2016; Bruno, 2015; Buller, 2014) (Figura 3, Tabla 3).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

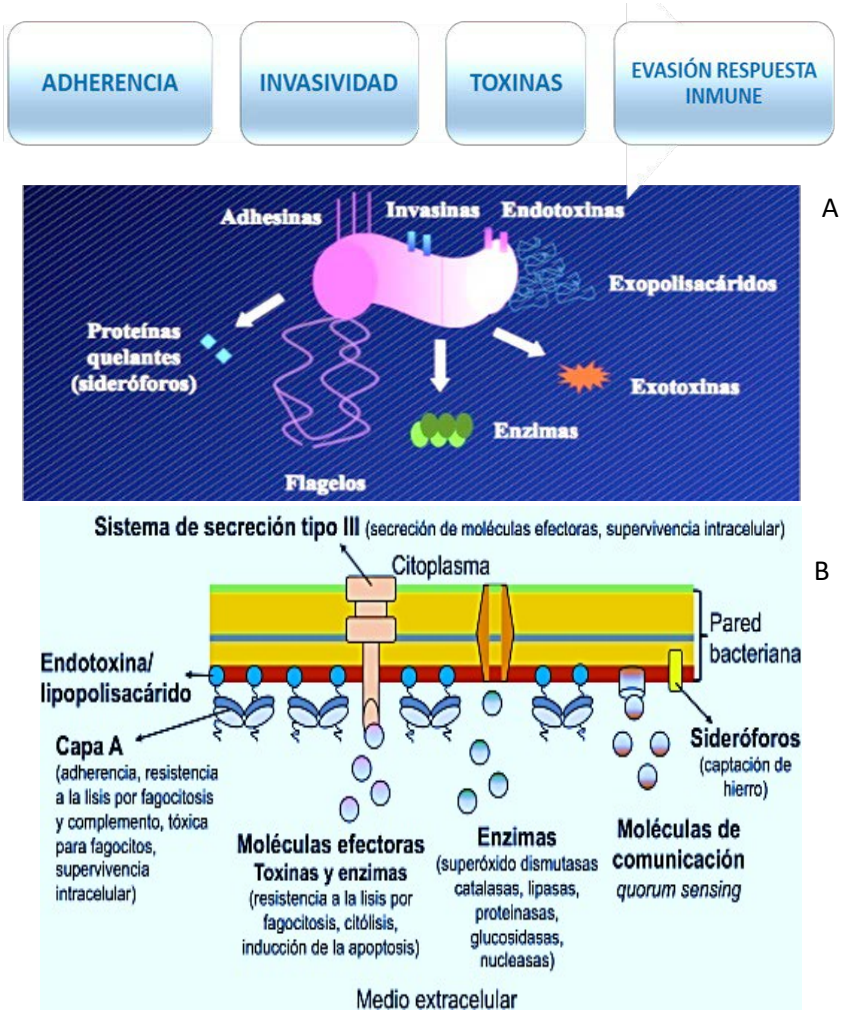


Figura 3. Factores generales de virulencia bacterianos y mecanismos descritos en Aeromonas salmonicida. Imagen elaborada por el autor de la Tesis.

El primer trabajo en el que se describió la producción de enzimas extracelulares por *A. salmonicida* data de 1953 (Griffin y col., 1953). Posteriormente, Klontz y col. (1966) demostraron "in vivo" los efectos (necrosis hematopoyética) de la inyección de los productos extracelulares diluidos en una solución salina.

La primera purificación y caracterización de la proteasa extracelular fue descrita por Dahle en 1971. Fuller y col. (1977) llegaron a purificar el factor leucocitolítico y lo inyectaron en peces sanos demostrando que se producía leucopenia. Ellis y col. (1981) demostraron que la inyección intraperitoneal (i.p) o/y intramuscular (i.m) de los productos extracelulares (ECP) en peces sanos, induce todas las lesiones asociadas con la furunculosis. Además, estos autores demostraron que el ECP tenía actividades hemolíticas, proteolíticas y leucocitolíticas

Desde entonces, muchos estudios se han hecho sobre los componentes de los ECP para identificar los factores responsables de la toxicidad y comprender su papel en la patogénesis de la furunculosis. Actualmente se sabe que los productos extracelulares de *A. salmonicida* contienen una gran cantidad de proteínas, algunas de las cuales se ha demostrado que tienen un papel relevante en la virulencia como son: las proteasas, citolisinas, hemolisinas, la glicerolfosfolípido colesterol aciltransferasa (GCAT). Sin embargo, el papel de otras enzimas extracelulares como las amilasas, esterasas, glucosidasas, enterotoxinas y dermatotoxinas aún no ha sido esclarecido.

Estudios posteriores, han demostrado fehacientemente que dos enzimas, una serin-proteasa y la GCAT son los principales factores responsables de la toxicidad del ECP de las cepas de *A. salmonicida* típicas. Aunque hasta hace pocos años existían discusiones entre los investigadores con respecto a la masa molecular de la proteasa (masa molecular entre 11 y 87 kDa dependiendo de las condiciones de cultivo

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

y de la cepa), Price y col. (1989), utilizando una colección de cepas que incluía a todas las utilizadas hasta entonces y sometiéndolas a las mismas condiciones de cultivo, demostró que las proteasas producidas por todas las cepas eran idénticas y tenían una masa molecular de 70 kDa. Empleando mutantes deficientes en la proteasa se ha demostrado que esta tiene un papel relevante en la nutrición, permitiéndole al microorganismo obtener aminoácidos por degradación de los tejidos del hospedador.

Dado que se ha observado que algunas cepas virulentas no producen proteasas cuando se cultivan en laboratorio, algunos investigadores se han planteado si ésta en realidad tiene un papel determinante en la virulencia. Sin embargo, utilizando antisueros frente a la proteasa de 70 kDa y fluido obtenido a partir de forúnculos de peces infectados se ha probado que las cepas que "in vitro" son deficientes en la producción de proteasas son capaces de producir el enzima cuando crecen "in vivo".

En 1988, Ellis evaluó el efecto de la inyección de ECP sin proteasas (tratados con inhibidores de proteasas) y con proteasas en peces sanos. El resultado reveló que la inyección de los ECP con proteasas era más letal que la de ECP sin proteasas. Por otra parte, se había observado que la inoculación de las proteasas purificadas en peces producía degradación de los tejidos y se activaba el sistema de coagulación, pero la dosis letal de la toxina era excesivamente alta (2,4 µg/g pez) en comparación a la dosis letal del ECP crudo (2,5-9,8 µg/g de pez).

Estos resultados parecían indicar que otras toxinas presentes en el ECP podían tener importancia en la patogénesis de la furunculosis. Lee y Ellis demostraron que existe un componente más tóxico que la proteasa en los ECP que es la GCAT, la mayor parte de la cual se encuentra formando un complejo con los LPS (GCAT/LPS) (Lee y Ellis, 1990; Lund y col., 2003).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Otros factores asociados con la virulencia

Otro potencial factor de virulencia que ha sido examinado en cepas de *A. salmonicida* es la capacidad para expresar un mecanismo de captación de hierro de alta afinidad (Figura 3), que puede competir con las proteínas quelantes del hierro presentes en el hospedador. Aunque se ha demostrado que tanto las cepas típicas como las atípicas crecen en condiciones restrictivas de hierro, el mecanismo empleado para la captación de este compuesto es diferente. Asi las cepas de *A. salmonicida* típicas producen un sideróforo no identificado de tipo catecol que no está relacionado con otros sideróforos ya conocidos como la amonobactina, la anguibactina o la enterobactina (Cipriano y Bullock, 2001). Najimi y col. (2008a) han identificado un grupo de genes (*asbG, asbC, asbD*) relacionados con la producción de sideróforos en *A. salmonicida*.

Aunque los sideróforos tienen una gran afinidad por el hierro, no pueden captarlo a partir de los grupos hemo. Algunas bacterias Gramnegativas, incluida la especie *A. salmonicida*, tienen capacidad para captar hierro de grupos hemo libres o bien de proteínas que contengan grupos hemo mediante mecanismos independientes de sideróforos. Najmi y col. (2008b) han identificado un grupo de genes implicados en el mecanismo de captación de hierro a partir de grupos hemo en *A. salmonicida.*

El quórum sensing (QS), un mecanismo de comunicación bacteriana basado en la expresión y reconocimiento de pequeñas moléculas señal, permite a las bacterias sincronizar la expresión de genes con la densidad poblacional. Las moléculas señal son excretadas extracelularmente y cuando se alcanza una cierta concentración umbral en el exterior difunden al interior de la célula y se unen a una proteína receptora; activando o reprimiendo la expresión de genes, entre ellos varios de los implicados en la virulencia de las bacterias.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En algunas bacterias Gram negativas, incluida *A. salmonicida,* se han descrito como moléculas señal homoserin-lactonas aciladas (AHL). En el caso de *A. salmonicida* el sistema QS se denomina AsaIR y la N-butanoil-L-homoserina lactona (C4-HSL) es la principal molécula señal, aunque la bacteria también produce tres AHL adicionales denominadas N-decanoil-L-homoserina lactona (C10-HSL), N-hexanoil-L-homoserina lactona (C6-HSL) y N-3-oxo-hexanoil-L-homoserina lactona (3-oxo-C6-HSL) (Swift et al., 1997, Rasch y col 2007). Rasch y col (2007) investigaron si existe alguna correlación entre la producción de moléculas de señalización QS y la expresión de factores de virulencia en *Aeromonas salmonicida* y el posible efecto de inhibidores de la señal de quórum (QSI) sobre la producción de factores de virulencia en *A. salmonicida*. Los resultados obtenidos indicaron que la producción de factores de virulencia como la proteasa, la lipasa, la capa A o la producción de pigmento no se correlacionaban con la producción y acumulación de AHL en el medio de crecimiento. Esto sugiere que, a nivel poblacional, las AHL no desempeñan un papel relevante en la regulación de los factores de virulencia en *Aeromonas salmonicida*. Sin embargo, estos autores también observaron que los QSI pueden inhibir la producción de proteasas en una cepa de *A. salmonicida*, concluyendo que es preciso realizar más estudios sobre la red de regulación de las QS y su posible implicación en la virulencia de *A. salmonicida*.

1.4. DIAGNÓSTICO, PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA FURUNCULOSIS

Los signos clínicos de las furunculosis causadas por las subespecies típicas y atípicas de *A. salmonicida* en los peces afectados son muy similares, lo que dificulta el diagnóstico presuntivo basado en la clínica. Por ello, el diagnóstico de la enfermedad se basa habitualmente en el aislamiento e identificación del patógeno.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Para el aislamiento se recomienda tomar muestras de las lesiones cutáneas y órganos internos (hígadio, riñón y bazo) (Austin y Austin, 2016, Buller, 2014) de animales muertos de forma natural o sacrificados por eutanasia. El aislamiento de la bacteria puede hacerse en medios generales suplementados con NaCl como el Agar de Soja Tripticaseína (TSA) y en medios enriquecidos como el agar sangre (Austin y Austin, 2016; Bruno 2015; Buller, 2014; Cipriano y Austin, 2011). Entre los factores que dificultan el diagnóstico bacteriológico se encuentran la existencia de formas no cultivables de *A. salmonicida* y de infecciones mixtas con otras bacterias que inhiben su crecimiento como *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* móviles y *Vibrio* spp. (Austin y Austin, 2016; Bruno 2015; Buller, 2014; Cipriano y Austin, 2011). Una vez obtenidos los cultivos puros la identificación del microorganismo se realiza en base al análisis de las características bioquímicas y fisiológicas del cultivo, utilizando métodos convencionales en tubo y placa o sistemas multiprueba de identificación bacteriana semiautomatizados como el API20E (BioMérieux) (Buller, 2014; Santos y col., 1993, Toranzo y col, 2005).

Las pruebas inmunológicas, basadas en reacciones antígeno-anticuerpo son métodos ampliamente utilizados para la detección de antígenos bacterianos en tejidos del pez o para la detección de anticuerpos específicos frente al patógeno en el suero de animales enfermos, así como para el diagnóstico confirmativo una vez aislado el agente causal. Las pruebas inmunológicas incluyen ensayos de aglutinación y métodos inmunoenzimáticos (ELISA, DotBlot, Western Blot e inmunohistoquímica (Austin y Austin, 2016, Buller, 2014, González y col, 2004, González y Santos, 2009; Coscelli y col 2014). Estás técnicas permiten la identificación de antígenos bacterianos en tejidos y sangre, o a partir de muestras de animales vivos, principalmente a partir del mucus de las superficies corporales (Austin y Austin, 2016, Buller, 2014, González y col, 2004, González y Santos, 2009).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 2. Composición de los ECP de *A. salmonicida* ssp. *salmonicida.*

Componentes ECP	***Referencia***
Proteasas	
Serin proteasa 70-kDa	Price y col. (1989) Ellis (1997)
Metaloproteasa	Rockey y col. (1988)
Toxinas dañinas para la membrana:	
Leucocitolisina	Fuller y col. (1977)
Glicoproteina citotóxica	Cipiano (1982); Tajima y col. (1983)
T-lisina (hemolisina)	Titball (1983)
H-lisina (hemolisina)	Titball y col (1985)
Salmolisina	Nomura y col. (1988)
GCAT	Lee y Ellis (1990)
GCAT / LPS	
Otros factores:	
Sideróforos	Chart y Trust (1983); Hirst y col. (1991)
Pigmento marrón	Donlon y col. (1983)
Esterasas	Hasting y Ellis (1988)
Amilasa	Campbell y col. (1990)
Ribonucleasa	Campbell y col. (1990)
Aryl-sulfatasa	Campbell y col. (1990)
glucosidasa	Campbell y col. (1990)
manosidasa	Campbell y col. (1990)
Fosfatasa alcalina	Campbell y col. (1990)
Fosfolipasa C	Campbell y col. (1990) Toxinas
potenciales:	
ASH3 (hemolisina de espectro)	Hirono y Aoki (1993) amplio
ASH4 (hemolisina, específica eritrocitos de peces)	Hirono y Aoki (1993) para

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Las pruebas de ELISA y Western Blot son también utilizadas para la determinación del título de anticuerpos específicos en sangre con el fin de conocer si el pez estuvo expuesto a un determinado patógeno (Romstad y col., 2012; Villumsen y col., 2012) y como indicador de la eficacia de las vacunas.

El principal fallo de las pruebas inmunológicas es el límite de detección, la existencia de antígenos que presentan reactividad cruzada y la dificultad en establecer si los antígenos derivan de microorganismos viables (González y col, 2004, González y Santos, 2009).

Con el fin de solventar los problemas de sensibilidad y especificidad se han desarrollado técnicas moleculares, basadas en la hibridación de ácidos nucleicos y en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), capaces de detectar secuencias de ácidos nucleicos específicas del patógeno. Entre estas técnicas la PCR convencional y la PCR en tiempo real (Figura 4) son los métodos más utilizados por su mayor sensibilidad y especificidad. Estos métodos se aplican tanto a la identificación de la bacteria en cultivos puros o mixtos, como a su detección en tejidos, fluidos (sangre, suero, exudados), agua y sedimento (Fernández-Álvarez, 2019; Fernández-Álvarez y col, 2016b; Austin y Austin, 2016; Beaz-Hidalgo y col, 2008; Buller, 2014).

En la actualidad existen métodos que permiten la detección mediante PCR de las subespecies típica y atípicas de *A. salmonicida* (Beaz-Hidalgo y col, 2008) y para la diferenciación de la subespecie típica *A. salmonicida* ssp. *salmonicida* (Fernández-Álvarez, 2019; Fernández-Álvarez y col, 2016 b). El diagnóstico microbiológico experimentó un notable avance en los últimos años gracias a la introducción de la espectrometría de masas-desorción/ionización mediada por láser asistida por matriz con detector de iones de tiempo de vuelo (EM-MALDI-TOF) (Figura 5). De hecho, la EM-MALDI-TOF es

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

una tecnología diagnóstica totalmente integrada en la actividad clínica diaria de los Servicios de Microbiología de numerosos centros hospitalarios y ha pasado a ser una prometedora herramienta relevante en los servicios de diagnóstico veterinario y de investigación a nivel mundial. Esta técnica ha mostrado gran eficacia en la diferenciación de las subespecies típica y atípicas de *Aeromonas salmonicida*) (Fernández-Álvarez, 2019; Fernández. Álvarez y col, 2019).

1.5. SISTEMA INMUNE DE LOS PECES

Al igual que otros animales vertebrados, los peces tienen una serie de mecanismos humorales y celulares específicos (inmunidad adquirida) y no específicos (inmunidad innata) que actúan de forma complementaria con el fin de proteger al organismo de agentes patógenos (Figura 6) (Dalmo y col., 1997; Ellis, 1999; Scapigliati y col., 1999; Dixon y Stet, 2001; Watts y col., 2001; Tort y col., 2003; Magnadóttir, 2006; Godoy, 2010; Gómez y col, 2013; Rauta y col, 2012; Secombes y Wang, 2012).

Los mecanismos de defensa inespecíficos, presentes en todos los seres vivos desde su nacimiento, están formados por las barreras mecánicas primarias constituidos por los epitelios y la capa de moco, componentes celulares y humorales que se activan en respuesta a propiedades químicas inherentes al agente agresor o elaborados por éste (Figura 6).

Los epitelios que recubren la superficie externa de los animales y su secreción o capa de moco sirven de protección permanente y son la primera línea de defensa, previniendo la colonización por microorganismos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

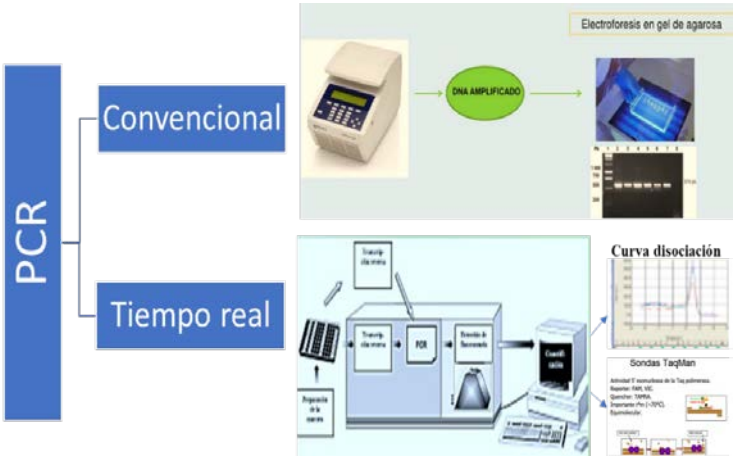


Figura 4. Métodos basados en PCR más utilizados para el diagnóstico de la furunculosis. Imagen elaborada por el autor de la Tesis.

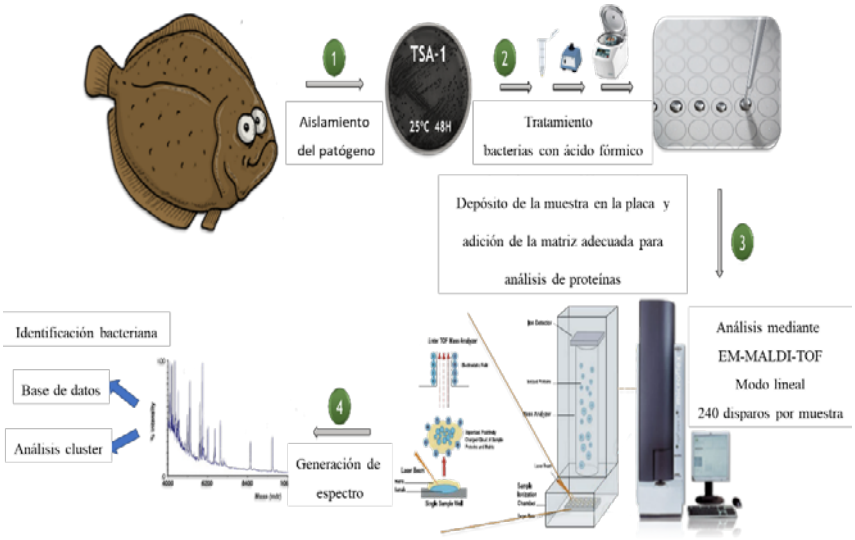


Figura 5. Flujo de trabajo para la identificación bacteriana mediante EM-MALDI-TOF. Imagen elaborada por el autor de la Tesis.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En los peces teleósteos, la mucosa del intestino, la piel y las branquias son las primeras barreras inmunitarias. En peces cartilaginosos y teleósteos, el sistema inmune adaptativo está basado en anticuerpos, células B y células T (Figura 6).

En la mucosa intestinal de teleósteos, la inmunoglobulina IgT / IgZ, tiene un papel preponderante en la inmunidad. Al igual que ocurre con la IgA e IgM en mamíferos, en teleosteos las Igs (IgM e IgT) se exportan a través de las mucosas vía el receptor polimérico de la inmunoglobulina (pIgR) que se expresa en el intestino y la piel (Gómez y col., 2013).

El moco es uno de los mecanismos de defensa innatos más relevantes a nivel de las mucosas. Entre las moléculas presentes en el moco destacan las mucinas y una mezcla compleja de proteínas que incluye precipitinas no específicas, proteína C reactiva, lisozima y enzimas proteolíticas que constituyen la barrera primaria de defensa química. En animales inmunizados se ha descrito la existencia de aglutininas e inmunoglobulinas específicas en el moco (Gómez y col., 2013). En el suero de peces existen compuestos responsables de la respuesta humoral no específica que son capaces de inhibir la multiplicación microbiana como son la transferrina, lisozima, lectinas, proteína C reactiva y el sistema del complemento (Figura 6) (Tort y col., 2003; Godoy, 2010, Pradipta, 2012; Secombes y Wang, 2012, Gómez y col., 2013, Zou y Secombes., 2016).

La transferrina, una proteína capaz de unirse al hierro y transportarlo desde las zonas de absorción a las de almacenamiento y utilización, actúa limitando la cantidad de hierro endógeno disponible para los microorganismos patógenos inhibiendo su multiplicación.

La lisozima es una enzima con acción antimicrobiana debido a su capacidad para degradar el peptidoglucano de la pared celular, causando la lisis bacteriana. La lisozima actúa preferentemente sobre

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

bacterias Grampositivas. En las bacterias Gramnegativas la enzima actúa después de que el complemento y otros enzimas hayan actuado sobre la membrana externa, dejando expuesta la capa de peptidoglucano. La enzima actúa además como opsonina, activando a los macrófagos y promoviendo la fagocitosis. La lisozima se ha detectado en suero, mucus, riñón, bazo e intestino de peces.

La enzima lisozima actúa como una proteína de fase aguda que es inducida muy rápidamente en respuesta a la presencia de bacterias o ante situaciones de estrés.

Las lectinas o hemaglutininas son proteínas que aglutinan células y/o precipitan glicoconjugados. Se han descrito en el mucus, huevos y suero de muchas especies de peces y se ha sugerido que su acción antimicrobiana es debida a su capacidad de actuar como opsoninas en el proceso de fagocitosis y de activar el complemento. La producción de aglutininas suele incrementarse tras la exposición a antígenos y/o otros compuestos. En cambio, las lectinas son glucoproteínas constitutivas que poseen capacidad para unirse a residuos de carbohidratos.

La proteína C reactiva puede estar presente como componente normal del suero, pero también se produce como respuesta a una situación de estrés o tras la exposición a antígenos. La proteína C reactiva puede activar el complemento y actuar como una opsonina. Además, puede unirse a los residuos de fosforilcolina presentes en la membrana celular de bacterias, parásitos u hongos provocando su aglutinación e induciendo su fagocitosis.

El sistema del complemento de peces está constituido por un grupo de proteínas séricas que desempeñan un importante papel en la inmunidad humoral y celular (Figura 6).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

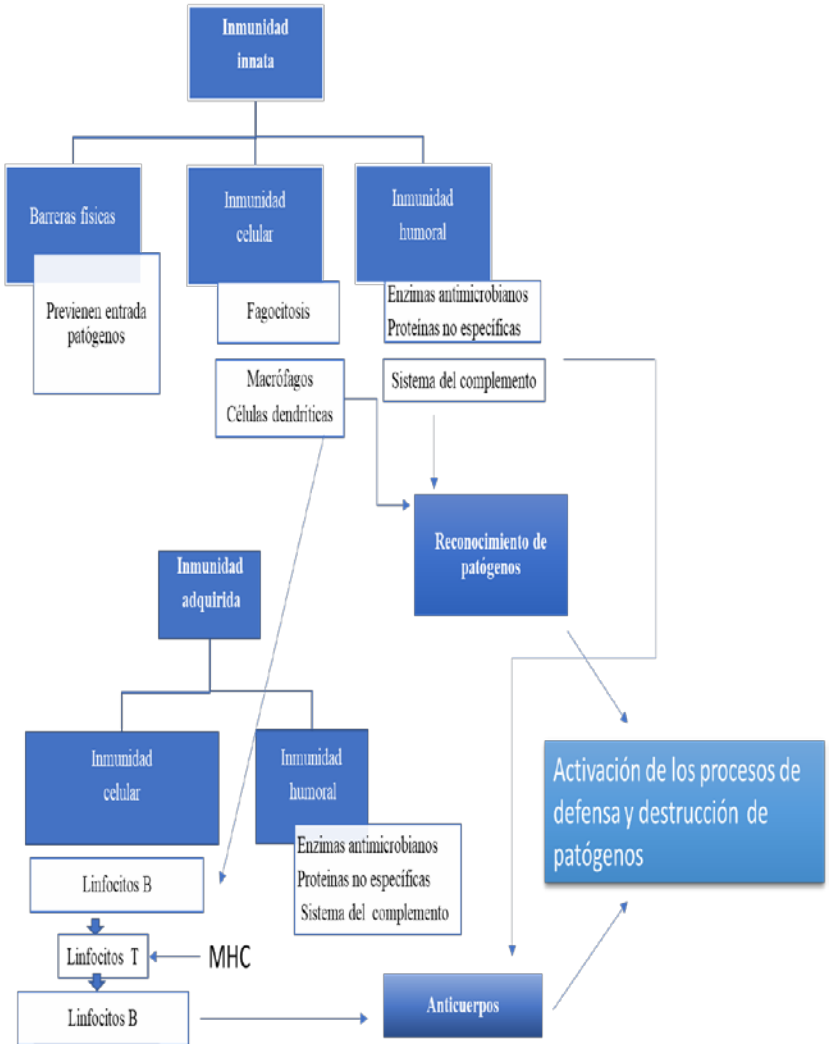


Figura 6. Componentes del sistema inmune de peces. Imagen elaborada por el autor de la Tesis.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La estimulación del sistema de complemento desencadena reacciones bioquímicas que se ven acompañadas por la generación de numerosos mediadores activos en la inflamación. Los componentes del complemento actúan de forma secuencial participando en la muerte y eliminación de microorganismos patógenos y en la activación de respuestas inespecíficas relacionadas con la inflamación. El sistema de complemento en peces puede ser activado a través de la vía clásica o dependiente de anticuerpo y la vía alternativa o independiente de anticuerpo.

En los peces el sistema del complemento constituye el factor humoral más importante dentro de la inmunidad innata. El complemento de peces tiene una temperatura de reacción menor (20-25ºC) que la de mamíferos (37ºC) y un mayor efecto antimicrobiano y tiene especificidad de especie de especie y grupo. En los peces se han descrito múltiples isoformas activas de la enzima C3, cuya posible función sea unirse a superficies específicas incrementando así la eficacia de eliminación del patógeno.

La tripsina y las células que contienen esta proteasa se encuentran en la epidermis, agallas e intestino, lo que indica una producción a nivel local y posterior secreción en el mucus de este compuesto.

Entre las células implicadas en los mecanismos de defensa no específicos se encuentran las células citotóxicas naturales y las células fagocíticas (Tafalla y Novoa, 2000; Tort y col., 2003; Godoy, 2010, Pradipta, 2012; Secombes y Wang, 2012, Gómez y col., 2013, Zou y Secombes., 2016).

Las células citotóxicas naturales están implicadas principalmente en la resistencia a protozoos y virus y la lisis de células tumorales. Su actividad depende del contacto directo con las células diana mediante

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

la unión a receptores específicos y se han descrito en sus membranas moléculas necesarias para el reconocimiento de células diana. La actividad citotóxica puede modificarse por la acción de inmunoestimulantes.

Las células fagocíticas incluyen neutrófilos, monocitos y macrófagos que tienen capacidad para reconocer partículas extrañas e internalizarlas mediante receptores de membrana dependientes de opsonización (reconocen inmunoglobulinas, complemento o fibronectina) o independientes de opsonización (receptores de mananos y glucanos). Una vez internalizadas se forma el fagosoma, en cuyo interior se produce la destrucción y digestión del material fagocitado gracias a la acción de metabolitos tóxicos (intra o extracelulares) dependientes o independientes del oxígeno producidos por los fagocitos (Figura 7).

Entre los metabolitos tóxicos independientes del oxígeno se encuentran las enzimas bactericidas y péptidos antimicrobianos (Figura 6). Los fagocitos poseen además actividad quitinolítica y proteolítica.

Entre los metabolitos tóxicos dependientes del oxígeno se encuentran el anión superóxido ($O2^{-}$), peróxido de hidrógeno (H2O2), radicales hidroxilos (-OH), singletes de oxígeno (1O2), compuestos halogenados como el ácido hipocloroso (HOCL) y compuestos derivados de la interacción del anión superóxido con el óxido nítrico (NO) como son los iones NO+ o NO-, dióxido de nitrógeno (NO2), nitrosotrioles o peroxinitritos (ONOO-). Los intermediarios reactivos del oxígeno se generan por acción de una NADPH-oxidasa ligada a la membrana que se activa tras la estimulación de los fagocitos por contacto con patógenos, péptidos, esferas de látex, ésteres de forbol, etc. Estas reacciones requieren un elevado consumo de oxígeno y es lo que se conoce como “estallido respiratorio dependiente del oxígeno”.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Los compuestos halogenados se generan por acción de la mieloperoxidasa presente en los gránulos citoplasmáticos de los fagocitos en presencia de H_2O_2 e iones de cloro. El NO se genera por acción de la NO sintetasa que puede ser constitutiva o inducible (Figura 7).

Los neutrófilos de peces participan en el proceso inflamatorio y presentan capacidad fagocítica y bactericida gracias a la liberación de enzimas y a la producción de metabolitos tóxicos dependientes del oxígeno.

Los monocitos son células presentes en la sangre que se diferencian en macrófagos cuando se establecen en tejidos. Tienen capacidad fagocítica y presentan actividad esterasa no específica y fosfatasa ácida y alcalina.

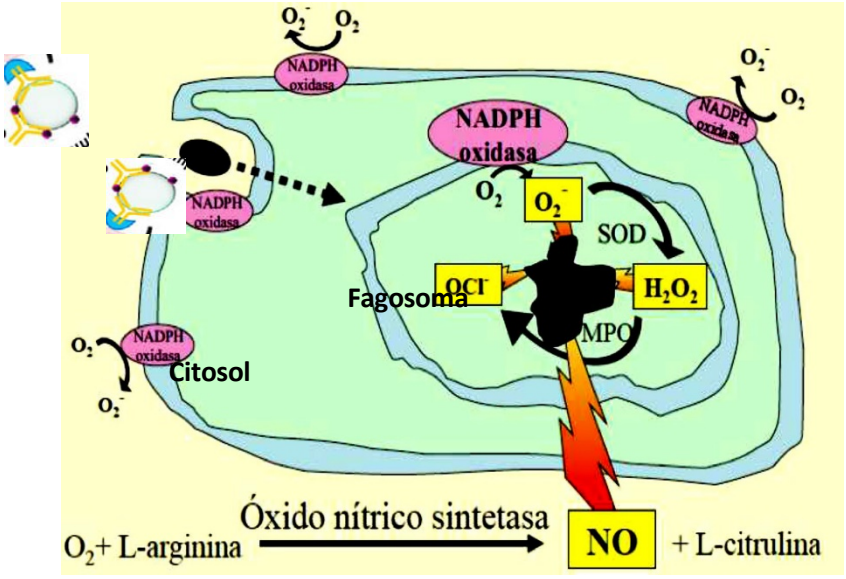


Figura 7. Generación de metabolitos tóxicos dependientes del oxígeno por los fagocitos. Imagen elaborada por el autor de la Tesis

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Los macrófagos están presentes en diferentes órganos de los peces, siendo especialmente abundantes en riñón, bazo y la cavidad peritoneal.

Los macrófagos poseen receptores para las inmunoglobulinas y el complemento y tienen un amplio rango de funciones basadas en la producción y secreción de enzimas, péptidos antimicrobianos, especies reactivas del oxígeno y nitrógeno y citoquinas, Además, los macrófagos forman parte de la respuesta inmune específica reconociendo y digiriendo sustancias exógenas, desencadenando la activación de los linfocitos (Figura 6) por liberación de inmunomoduladores, presentando antígenos en su membrana mediante moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II (Figura 6).

El sistema inmune específico está formado por los linfocitos y sus productos, incluidos los anticuerpos (Figura 6). Los mecanismos específicos requieren la inducción por parte del antígeno, la discriminación de los elementos propios y extraños, especificidad hacia el antígeno y memoria inmunológica.

La respuesta humoral específica está mediada por los anticuerpos o inmunoglobulinas (Igs), glicoproteínas producidas por el pez en respuesta a un antígeno y que aparecen fundamentalmente en el plasma, la sangre y otras secreciones (Ellis, 1999; Nielsen y Esteve-Gassent, 2006). La inmunoglobulina predominante en los peces es la IgM, una proteína tetramérica formada por dos cadenas ligeras y dos pesadas y que presenta una masa molecular de 700 kDa. Se han identificado además dos isotipos de cadena pesada, IgD e IgT (Rauta y col., 2012). IgD se cree que se encuentra en la membrana de las células B, donde puede actuar como un receptor. También se ha descrito el isotipo IgZ en peces. El isotipo de IgZ/IgT se ha descrito en espinoso (*Gasterosteus aculeatus*) y carpa (*Cyprinus carpio*) y parece ser un isotipo de cadena pesada único limitado a peces Osteictios (Secombes y Wang, 2012). La

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Ig T es responsable de la inmunidad a nivel intestinal.

Entre los factores que influyen en la producción de inmunoglobulinas en los peces, destacan el estado de inmunocompetencia del individuo, la ruta de entrada del antígeno, la naturaleza de este, la dosis, la temperatura del agua y el uso de estimulantes.

La inmunidad celular específica está mediada por la cooperación entre linfocitos, fagocitos mononucleares y moléculas efectoras. En los peces hay una serie de inmunomoduladores cuyas funciones se asemejan bastante a las citoquinas de mamíferos (Secombes y Wang, 2012, Zou y Secombes., 2016).

La inmunidad celular específica está mediada por la cooperación entre linfocitos, fagocitos mononucleares y moléculas efectoras. En los peces hay una serie de inmunomoduladores cuyas funciones se asemejan bastante a las citoquinas de mamíferos (Secombes y Wang, 2012, Zou y Secombes., 2016). Las citoquinas atraen los leucocitos al sitio de la infección y activan los mecanismos antimicrobianos para matar a los invasores. También existe un sistema genético polimórfico parecido al complejo principal de histocompatibilidad de mamíferos. Este sistema está implicado en el reconocimiento del antígeno por parte de células accesorias o presentadoras de antígeno. Estas células (monocitos y macrófagos) presentan el antígeno procesado a los linfocitos para activar la respuesta específica (Figura 6).

La importancia relativa de los mecanismos de defensa innato y específico puede variar con la edad del pez y están influenciados por distintos factores (factores ambientales, parámetros abióticos del agua, etc.) (Ellis, 1999; Dixon y Stet, 2001; Watts y col., 2001).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.6. VACUNAS Y ESTRATEGIAS DE VACUNACIÓN EN ACUICULTURA

En las últimas décadas la industria de la acuicultura ha logrado grandes avances en la producción de pescado, pero también ha sufrido considerables pérdidas económicas como consecuencia de brotes de enfermedades causadas por microorganismos patógenos virales, bacterianos y parasitarios, siendo las de etiología bacteriana las de mayor relevancia en la acuicultura marina y continental (Toranzo y col, 2005). Las enfermedades bacterianas pueden ser controladas por diferentes métodos, incluyendo la utilización de agentes quimioterápicos, evitar el contacto de los peces con el agente patógeno, reproductores libres de patógenos específicos, la optimización de la alimentación y la mejora de la calidad de los alimentos, control de la calidad del agua…) y el empleo de vacunas.

La vacunación constituye uno de los principales métodos de prevención de enfermedades bacterianas en acuicultura (Gudding y col, 1999; Santos, 2005; Toranzo y col, 1997; Toranzo y col, 2009; Ma y col, 2019; Mondal y Thomas, 2022). Las primeras descripciones de inmunización de peces datan de 1940 (Snieszko, y Friddle, 1949), pero hasta el año 1976 no se comercializó la primera vacuna. Desde entonces la investigación se centró en el estudio de la respuesta inmune de los peces, la identificación de los antígenos capaces de inducir una respuesta inmune protectora y en el desarrollo de métodos adecuados de inmunización masiva con el fin de obtener una inmunidad elevada y duradera (Austin y Austin, 1999, Gudding y col, 1999; Toranzo y col, 1997; Santos, 2005; Evensen, 2009; Toranzo y col, 2009 Ma y col, 2019; Mondal y Thomas, 2022).

Las vacunas usadas en acuicultura están basadas en la inmunización directa con antígenos naturales (organismos enteros, antígenos purificados a partir de los microorganismos patógenos, o producidos *in vitro* por sistemas de expresión recombinantes),

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

antígenos sintéticos (péptidos sintéticos) o con preparaciones que inducen la síntesis de antígenos protectores dentro del hospedador (cepas atenuadas, vectores recombinantes y vacunas génicas o vacunas de ADN) (Ma y col, 2019; Mondal y Thomas, 2022; Santos, 2005). Aunque se han comercializado algunas vacunas vivas atenuadas (Ma y col., 2019) su uso ha suscitado preocupación en cuanto a su seguridad para el medio ambiente. La Figura 8 muestra los principales tipos de vacuna utilizados en acuicultura, modos de producción y administración. En las vacunas elaboradas con organismos inactivados, a menos que se añadan adyuvantes para mejorar la potencia de la formulación de la vacuna, no se suele conseguir una protección adecuada y duradera. El uso de sistemas adyuvantes a base de aceite ha demostrado inducir inmunidad protectora duradera contra la furunculosis en peces salmónidos (Midtlyng y col. 1996a), y reduce en gran medida el riesgo de enfermedad (Midtlyng 1998, Lillehaug et al. 2003). Sin embargo, el uso de vacunas con adyuvantes de aceite ha provocado efectos secundarios considerables (Poppe y Breck 1997, Midtlyng 1998), de los cuales los más frecuentes son las lesiones en el lugar de la inyección (Midtlyng y col., 1996b, Lund et al. 1997), adherencias entre órganos internos (Midtlyng 1996a), disminución del apetito y crecimiento (Midtlyng et al. 1996b, Sørum & Damsgård 2004) y mal funcionamiento de los órganos reproductores.

Las vacunas inyectables disponibles en el mercado son capaces de inducir una protección significativa en peces salmónidos contra enfermedades bacterianas como la vibriosis, las úlceras de invierno y la furunculosis. Sin embargo, en el caso del rodaballo, la protección no suele superar los 4-6 meses tras la inmunización por inyección con la vacuna frente a la furunculosis (Santos, 2005; Toranzo y col, 2005).

Actualmente para las especies de peces de alto valor, como los salmónidos, doradas, lubinas, rodaballos y lenguados se utilizan vacunas multivalentes que comprenden antígenos de varios patógenos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(Santos, 2005, Mondal y Thomas, 2022).

Con respecto al método de inmunización, las vacunas se administran a los peces por vía oral (incorporada en el alimento), mediante inyección (intraperitoneal o intramuscular) y mediante inmersión corta o prolongada en la vacuna diluida (Adams et al. 2008; Mondal y Thomas, 2022; Santos, 2005; Toranzo y col, 2009). De todos estos métodos, la inyección confiere los mejores niveles de protección (preferiblemente vía intraperitoneal), permite el uso de inmunoestimulantes y es el más económico para peces de gran tamaño.

Las desventajas son su elevado coste en tiempo y personal y el estrés que ocasiona en los peces. En cualquier caso, para la elección de la vía de administración debe tenerse en cuenta factores relacionados con el patógeno, su vía de infección, el estado de la memoria inmunológica de los peces, pero también principios subyacentes, como son los costes de mano de obra, la fase de vida del del pez, etc. (Yanong y Erlacher-Reid 2012). Los métodos de administración elegidos pueden determinar la respuesta inmunológica inducida, así como el nivel de protección alcanzado contra el patógeno de interés (Palm Jr et al. 1998).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

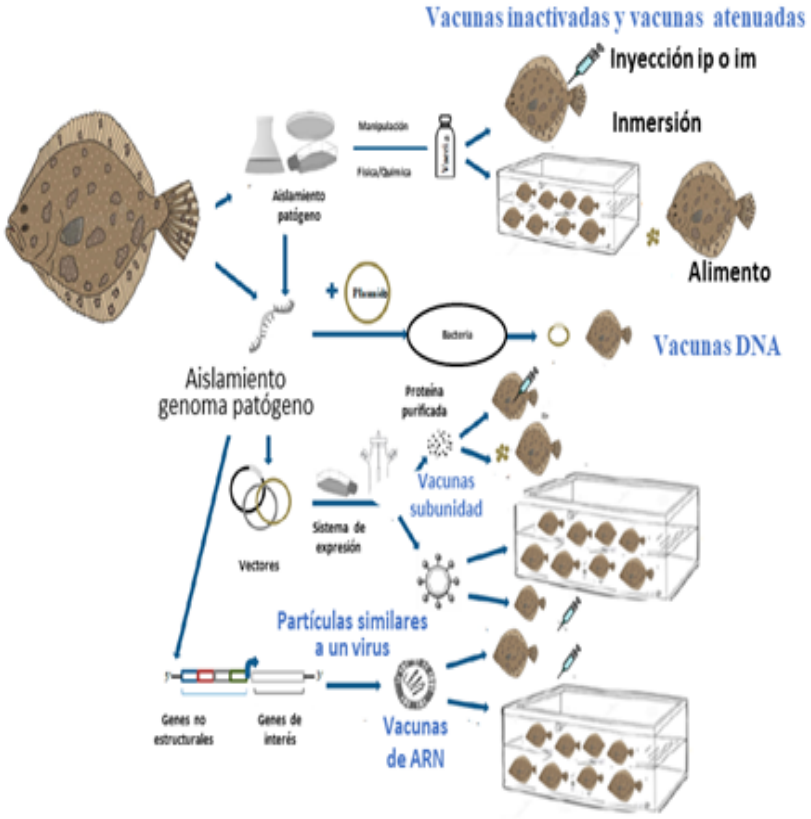


Figura 8 Tipos de vacuna utilizados en acuicultura, métodos de producción y de administración. Imagen del autor de la Tesis.

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2. OBJETIVOS

Aeromonas salmonicida subsp. *salmonicida,* es el agente causal de furunculosis típica, una enfermedad sistémica que afecta a peces salmónidos y no salmónidos en todo el mundo. La enfermedad causa alta mortalidad y morbilidad y lesiones ulcerativas que alteran la apariencia del pescado, reduciendo su valor comercial. La identificación de los determinantes de la virulencia y de especificidad de hospedador y el conocimiento de la respuesta de los peces frente al patógeno o sus antígenos son esenciales para la comprensión de los mecanismos patogénicos y el diseño de nuevas estrategias y terapias para el control de la furunculosis. Por todo ello en el presente estudio nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

1) Estudio taxonómico y de la virulencia de *Aeromonas salmonicida.*

2) Optimización de técnicas para evaluar la respuesta inmunitaria de rodaballo.

3) Efecto de la infección con *A. salmonicida* sobre la respuesta inmunitaria de rodaballo.

4) Evaluación de la respuesta inmune de rodaballos inmunizados frente a *A. salmonicida.*

Para llevar a cabo estos objetivos se utilizaron 10 cepas de *Aeromonas* spp. de referencia (Tabla 3) obtenidas de colecciones de cultivos y 50 cepas clínicas de *Aeromonas salmonicida*, aisladas de peces enfermos (Tabla 4):

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 3. Cepas de A. salmonicida utilizadas en el presente estudio.

Cepas	Especie bacteriana	Origen
ATCC 33658	*A. salmonicida* ssp *salmonicida*	*S. salar*, USA
CECT 4235	*A. salmonicida* ssp *salmonicida*	*S.fontinalis*, ND
NCIMB 2261	*A. salmonicida* ssp *salmonicida*	*S. salar*, Scotland
CECT 895	*A. salmonicida* ssp *achromogenes*	*S. trutta*, USA
CECT 4238	*A. salmonicida* ssp *achromogenes*	*S. trutta*, Scotland
CECT 4239	*A. salmonicida* ssp *achromogenes*	*P. phoxinus*, Norway
CECT 896	*A. salmonicida.* ssp *masoucida*	*O. masou*, Japan
CECT 5179	*A. salmonicida.* ssp *smithia*	*R. rutilus*, UK
MT416	*A. salmonicida* ssp *salmonicida*	*S. salar*, Escocia
MT004	*A. salmonicida* ssp *salmonicida*	*S. salar*, Escocia

ATCC, colección Americana de Cultivos Tipo
CECT, Colección Española de cultivos tipo
NCIMB, Colección nacional de bacterias marinas e industriales

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 4. Aislados clínicos de Aeromonas salmonicida utilizadas en el presente estudio.

Cepas	Especie bacteriana	Origen
SK401/06	*A. salmonicida*	*Oncorhynchus mykiss*, 2006
AsV09.1.15	*A. salmonicida*	*O. mykiss*, 2015
AsV09.2.15	*A. salmonicida*	*O. mykiss*, 2015
AsV09.3.15	*A. salmonicida*	*O. mykiss*, 2015
AsV09.4.15	*A. salmonicida*	*O. mykiss*,2015
AsV09.6.15	*A. salmonicida*	*O. mykiss*,2015
379/05	*A. salmonicida*.	*Salmo trutta*, 2005
SK197/06	*A. salmonicida*.	*S. trutta*, 2006
SK19/08	*A. salmonicida*.	*S. trutta*, 2008
SK112/06	*A. salmonicida*	*Salmo salar*, 2006
L3R	*A. salmonicida.*	*Petromyzon marinus*, 2000
L9R1	*A. salmonicida*.	*P. marinus*, 2000
L9R2	*A. salmonicida.*	*P. marinus*, 2000
L3S1	*A. salmonicida.*	*P. marinus*, 2000
L10S1	*A. salmonicida.*	*P marinus*, 2000
1.50	*A. salmonicida.*	*Scophthalmus maximus*
TO3.8.4	*A. salmonicida.*	*S. maximus*, ND
AR27.1	*A. salmonicida.*	*S. maximus*, ND
TO93.2.1	*A. salmonicida*	*S. maximus*, 1996
T096.7.1	*A. salmonicida*	*S. maximus*, 1996
TO97.3.1	*A. salmonicida*	*S. maximus*, 1997
IAs57.1	*A. salmonicida*	*S. maximus*, 2001
TAC7.2.1	*A. salmonicida*	*S. maximus*, 2001
IAs01.5	*A. salmonicida*	*S. maximus*, 2001
IAs06.1	*A. salmonicida.*	*S. maximus*, 2006
IAs06.3	*A. salmonicida.*	*S. maximus*, 2006
IAs06.5	*A. salmonicida.*	*S. maximus*, 2006
IAs06.1	*A. salmonicida.*	*S. maximus, 2006*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

IAs06.3	*A. salmonicida.*	*S. maximus, 2006*
IAs07.1	*A. salmonicida.*	*S. maximus*, 2007
IAs07.7	*A. salmonicida.*	*S. maximus*, 2007
IAs07.13	*A. salmonicida.*	*S. maximus*, 2007
IAs07.17	*A. salmonicida.*	*S. maximus* 2007
IAs07.20	*A. salmonicida.*	*S. maximus*, 2007
IAs07.24	*A. salmonicida.*	*S. maximus*, 2007
IAs07.26	*A. salmonicida.*	*S. maximus,* 2007
CIAS08.4	*A. salmonicida*.	*S. maximus*, 2008
SK366/09	*A. salmonicida*	*S. maximus*, 2009
SK267/09	*A. salmonicida*	*S. maximus*, 2009
SK50/17 47	*A. salmonicida*	S. maximus, 2017
SK152/18	*A. salmonicida*	*S. maximus,*2018
SK181/12	*A. salmonicida*	*D. labrax*, 2012
SK164/12	*A. salmonicida*	*D.labrax*, 2012
SK37/18 TK5	*A. salmonicida*	*S. aurata*, 2018
SK37/18 TK7	*A. salmonicida*	*S. aurata*, 2018
SK37/18 TK25	*A. salmonicida*	*A. salmonicida*
SK37/18 Abs	*A. salmonicida*	*S. aurata*, 2018
SK43/18	*A. salmonicida*	*S. aurata*, 2018
SK43/18 (2)	*A. salmonicida*	*S. aurata*, 2018
SK23/18 L-1	*A. salmonicida*	*S. aurata*, 2018
SK23/18 L-5	*A. salmonicida*	*S. aurata*, 2018
SK23/18	*A. salmonicida*	*S. aurata*, 2018

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 3

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3 ESTUDIO TAXONÓMICO Y VIRULENCIA DE *AEROMONAS SALMONICIDA*

3.1. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.1. Cepas bacterianas. Cultivo y conservación

Las cepas se cultivaron rutinariamente en medio Agar de Soja Tripticaseína suplementado con NaCl (TSA-1) a una concentración final del 1% (p/v). Las cepas se mantuvieron congeladas a -80°C en viales con caldo de soja Tripticaseína (TSC) suplementado con 15% (v/v) de glicerol. Las condiciones de cultivo y conservación de las cepas descritas en este apartado se han utilizado a lo largo de todo el trabajo.

3.1.2. Identificación de los aislados

3.1.2.1. Métodos microbiológicos

Para la identificación de los aislados se han utilizado métodos convencionales en tubo y placa y el sistema semiautomatizado multiprueba comercial API 20E (BioMerieux).

Métodos convencionales en tubo y placa

Las cepas de *Aeromonas salmonicida*, se sometieron a una serie de pruebas morfológicas, bioquímicas, fisiológicas, siguiendo los procedimientos descritos por Mac Fadin (1980). En los ensayos se emplearon como inóculo suspensiones bacterianas preparadas en

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

solución salina y ajustados a una densidad celular de 10^9 cel/ml por comparación de su turbidez con la del tubo 3 de la escala MacFarland. Las condiciones de cultivo fueron: 22º C en condiciones aeróbicas durante 24-48 h a excepción de las pruebas de fermentaciones de azúcares en las que dicho período se amplió a 7 días. Los principales caracteres determinados fueron los siguientes:

*Morfología y movilidad***:** la morfología de las células se estudió mediante observación directa al microscopio de contraste de fases (400x) de una muestra bacteriana tomada de un cultivo líquido en fase exponencial de crecimiento. La determinación de la talla se hizo utilizando un micrómetro ocular.

*Carácter Gram***:** el carácter Gram se determinó según el método clásico de tinción y el método de Buck (1982).

Citocromo–Oxidasa: se depositó una fracción de bacterias de un cultivo fresco en placa sobre un papel de filtro Whatman nº1 previamente impregnado con una solución acuosa al 1% (p/v) de N'N'N'-tetrametil- para-fenilendiamina. Las bacterias que presentan el enzima citocromo- oxidasa actúan inmediatamente sobre el reactivo, produciendo una coloración violeta sobre el papel (compuesto oxidado).

Catalasa: la producción de catalasa se determinó por adición de unas gotas de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3% sobre una fracción de un cultivo en placa de 24h; la formación inmediata de burbujas indica una reacción positiva.

Oxidación/Fermentación: este carácter se determinó inoculando cada cepa por duplicado en tubos con medio basal 0/F de Hugh y Leifson (Difco) suplementado con un 1% de glucosa. Uno de los tubos se mantiene en condiciones aeróbicas y el otro en anaerobiosis

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

recubriendo la superficie del medio con parafina líquida estéril. Los tubos se incubaron durante 7-15 días. La aparición de color amarillo en los dos tubos indica que la bacteria es fermentativa. Si el color amarillo aparece sólo en el tubo abierto es indicativo de que la bacteria utiliza el azúcar por vía oxidativa.

Formación de indol: se determinó en el medio caldo de triptona al 1% (p/v). Tras el período de incubación, se añadió el reactivo de Kovacs. La aparición de un anillo rojizo en la superficie del medio tras la adición del reactivo indica que el microorganismo es capaz de producir el indol a partir del triptófano.

Prueba de Voges-Proskauer: determina la capacidad de un microorganismo de producir un compuesto neutro (acetoína) por fermentación de la glucosa. Las cepas se sembraron en el medio caldo base de Rojo de Metilo-Voges Proskauer (RM-VP, Difco), después de un tiempo de incubación (48-72 h) a 25º C en agitación, se añadieron los reactivosα-naftol al 5% (p/v) en etanol e hidróxido potásico (KOH) al 40% (p/v). La reacción positiva se manifiesta por la aparición de un anillo marrón-rojizo en la superficie del medio que indica la producción de acetoína a partir de glucosa mediante la fermentación butanodiólica.

Pruebas del Rojo de Metilo: comprobar la capacidad de los organismos para producir y mantener estable los productos terminales ácidos resultantes de la fermentación de la glucosa. El medio usado en esta prueba fue el RM-VP. Después de inocular las cepas bacterianas en 3 ml de medio e incubarlas durante 48-72 h se añade unas gotas del reactivo de rojo de metilo: rojo de metilo al 0,02% (p/v) en etanol al 55% (v/v). La reacción se considera positiva si el colorante se mantiene su color rojo en la superficie del medio (lo que indica que el pH es próximo al 4) y negativa si el color se cambia a amarillo (pH superior a 6).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

*Descarboxilación de los aminoácidos***:** determina la presencia del enzima decarboxilasa. El ensayo se realizó en el medio basal de Möeller (Difco) suplementado con los aminoácidos L-arginina; L-ornitina y L-lisina (en forma de clorohidratos) a una concentración del 1%. Debido a que la reacción tiene lugar en anaerobiosis, los tubos inoculados, se cubren con una tapa de aceite mineral estéril. La presencia de turbidez y la alcalinización del medio son indicativos de que las bacterias presentan actividad descarboxilasa.

Produción de ácido a partir de azúcares y polialcoholes: se utilizó el mismo medio basal O/F suplementado con los correspondientes azúcares y polialcoholes a una concentración del 1%. En el presente estudio se ha examinado la utilización de glucosa; galactosa; sacarosa; arabinosa; manitol; sorbitol; inositol; fructosa; manosa. La lectura de los resultados es análoga a la descrita para el carácter O/F.

Utilización de citrato: se realizó en tubos de agar inclinado del medio Citrato de Simmons pH 6,8 (Difco). El crecimiento y la aparición de color azul en la superficie del agar inclinado indica que la bacteria es capaz de crecer utilizando el citrato como única fuente de carbono.

Reducción de nitrato: determina la capacidad de un microorganismo de reducir el nitrato a nitrito o a nitrógeno libre. Se realiza en tubos de Caldo Nitrato (Difco). Una vez inoculados los tubos se mantienen en agitación durante 48h. La lectura se realiza tras la adición de los reactivos A (α-naftilamina al 0,5%) y B (sulfanílico al 0,8%). La aparición de color rojizo indica una reacción positiva.

Galactosidasa: Los aislados se sembraron previamente en medio con lactosa para inducir la síntesis del enzima y posteriormente se inocularon en el medio ONPG-agar (Agar Marino +ONPG + Tampón Na_2 HPO_4). Las colonias que dan reacción positiva se tornan amarillas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Hidrolisis de gelatina: La actividad gelatinasa de las cepas aisladas se evaluó en placas de TSA-1 suplementadas con 1% (p/v) de gelatina. Al acabo de 2 días de incubación se llevó a cabo el revelado añadiendo cloruro de mercurio al 1% (p/v) en agua destilada sobre la superficie de las placas inoculadas. Se consideró un resultado positivo la aparición de halos claros alrededor de las colonias bacterianas.

Hidrólisis de tirosina: Se evaluó en placas de TSA-1 suplementando con L-tirosina al 0,5 % (p/v) y agar al 0,2 % (p/v). La aparición de pigmentación marrón alrededor de las colonias después de 2 días indica una reacción positiva.

Digestión de la caseína: El ensayo se realizó en placas de TSA-1 con una concentración final de un 1% (p/v) de leche descremada. La aparición de halos de aclaramiento alrededor de las colonias se consideró como un resultado positivo.

Producción de esterasas: Se determinó en agar TSA-1 suplementado con un 1% de Tween 80 ó Tween 20. La aparición de un halo opaco en torno al inóculo indica la presencia del enzima

Amilasa: la producción de amilasa se determinó en placas de TSA-1 suplementadas con un 1% de almidón. Las reacciones se revelaron por adición del reactivo Lugol. La aparición de halos claros en torno a las colonias indica la producción de amilasa.

Producción de DNAsa: Se evaluó en placas de agar DNA (Cultimed). Transcurrido el tiempo de incubación, se bañaron las placas con una solución 1N de HCl. La aparición de un halo alrededor de las colonias indicaba el resultado positivo.

*Hidrólisis de esculina***:** La hidrólisis del glucósido esculina en esculetina se evaluó en placas de TSA-1 conteniendo un 0,2 % (p/v) de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

esculina y 0,05 % (p/v) de citrato férrico como indicador. La reacción positiva se manifiesta por la aparición de un halo color negro en torno a los inóculos.

Crecimiento a distintas temperaturas: se determinó en placas de TSA- 1 incubando a distintas temperaturas (4ºC;15ºC; 25ºC; 37ºC; 44ºC) durante 24-96h. Para 4ºC, la lectura se hizo después de 7 días.

*Requerimiento de sales (NaCl):*se evaluó en placas de medio basal (MB) (neopeptona, 4g/l; extracto de levadura, 1g/l; agar, 15g/l) preparado en agua destilada en la que se han añadido distintas concentraciones de NaCl :0%, 1%, 3%; 5%; 8%; 10% (p/v) las placas se incubaron durante un periodo de 48h a 15 días.

Sistemas multiprueba API 20-E

Son sistemas comerciales diseñados para la identificación de enterobacterias y otros bacilos Gramnegativos no exigentes, mediante una batería de pruebas bioquímicas y una base de datos.

La galería API 20-E se inoculó con una suspensión bacteriana preparada en solución salina siguiendo las instrucciones del fabricante. Durante la incubación (24-48h a una temperatura de 22Cº) el metabolismo de la bacteria produce cambios del color de los medios bien de forma espontánea o bien al añadir los reactivos (para el Indol; VP; RM; Nitrato). La identificación se realiza mediante la tabla de identificación API 20-E.

La identificación de las cepas se realizó además utilizando el software libre Bacterial Identification ABIS online.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Sensibilidad a agentes quimioterápicos

La sensibilidad de los aislados a diferentes agentes quimioterápicos se determinó por el método de difusión en placas de Müller-Hinton Agar (MHA) (Oxoid). Los agentes antimicrobianos empleados en la realización de los antibiogramas, así como sus concentraciones (expresadas en µg/disco) se reflejan en la Tabla 5. Los discos de agentes antimicrobianos fueron suministrados por la casa comercial Oxoid. Por cada placa se utilizaron como máximo tres discos, excepto el agente vibriostático pteridina que se probó por separado. Debido a que nuestras cepas han sido aisladas a partir de animales poiquilotermos, no se han seguido los criterios clínicos para la interpretación de los resultados. Por tanto, en este estudio la aparición de un halo de inhibición del crecimiento en torno al disco se consideró indicativo de la sensibilidad de la bacteria al agente antimicrobiano.

Tabla 5. Antimicrobianos evaluados en el estudio.

Compuesto antimicrobiano	Concentración (µg/disco)
Ampicilina (AMP)	10
Cloranfenicol (C)	30
Oxitetraciclina (OT)	30
Norfloxacina (NOR)	30
Enrofloxacina (ENR)	10
Trimetoprim-Sulfametoxazol (SXT)	5
Flumequine (FLU)	25
Florfenicol (FLOR)	30

3.1.2.2. Tipado de las cepas por métodos serológicos

La caracterización serológica de las cepas de *Aeromonas*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

salmonicida se realizó empleando las técnicas serológicas de aglutinación en portaobjetos y ensayo Dot Blot. Para estos ensayos se emplearon sueros frente a la célula completa inactivada con formaldehido y la suspensión del antígeno "O".

Preparación de antígenos y obtención de antisueros

Los antisueros usados para el estudio de las cepas de *Aeromonas salmonicida* se obtuvieron mediante inyección en conejos de raza "neozelandesa" de 2,5 kg de peso, siguiendo el método descrito por Santos y col (1995).

Obtención de antígenos

Las cepas de *Aeromonas salmonicida ssp salmonicida* TO967.1 y NCIMB 2261 se cultivaron en medio TSA-1 durante 48 h a 22Cº. Finalizada la incubación se suspendieron las células en tampón fosfato salino suplementado con formaldehido a una concentración final de 0,3% (v/v), la suspensión obtenida se mantuvo tres horas a 22ºC en agitación (200 rpm), al cabo de las cuales se transfirió a 4ºC. Las células inactivadas con formol se lavaron tres veces por centrifugación (4000xg) durante 20 min y se suspendieron en formaldehido al 0,1 % (v/v) en PBS. Las suspensiones celulares inactivadas se ajustaron a una concentración de 10^9 cel/ml (Tubo 3 de la escala de Mac Farland).

Inmunizacion de los conejos

Antes de proceder a la inmunización de los conejos, se tomó una muestra de sangre (10 ml) para obtener el suero control (suero no inmune).

Las suspensiones bacterianas inactivadas se inyectaron en los conejos por vía venosa en dosis de 0,2; 0,4; 0,8;1,0 ml administradas cada tres días. Después de dos semanas se repitió el proceso de inmunización utilizando siempre dosis de 1 ml (dosis de recuerdo).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Finalmente se extrajo la máxima cantidad de sangre posible mediante punción cardíaca, previa anestesia de los animales con una mezcla (5:1 v/v) de clorohidrato de 2-(O-clorofenil)-2-metilaminociclohexanona (0,05 g/ml (ketolar, Parke -Davis) y clorhidrato de 2-(2,6-xidilino)-,6-dihidro-4-h-1,3-tiazina (0,02h/ml0 (Rompún, Bayer). La sangre extraída se dejó coagular a temperatura ambiente durante 2h y se mantuvo 12h a 4º C, al cabo de este tiempo se separó el suero de los restos sólidos por centrifugación durante 10min. a 3000xg. El suero obtenido se distribuyó en alícuotas y se mantuvo a una temperatura de -20ºC hasta su uso.

La titulación de los sueros se llevó a cabo en placas de microtitulación de 96 pocillos con fondo en "U" (Sterilin), utilizado diluciones seriadas de los antisueros (1/2-1/2048) mezcladas con volúmenes iguales de las suspensiones de células formalizadas de las cepas homólogas. El título de cada antisuero se definió como el recíproco de la mayor dilución de dicho suero que mostró una reacción positiva después de la incubación durante 18h a 15ºC.

Aglutinación en portaobjetos

El ensayo de aglutinación se realizó sobre portaobjetos mezclando volúmenes iguales de la suspensión antigénica y el antisuero diluido 1/10, siguiendo el procedimiento descrito por Santos y col (1995). Una aglutinación rápida y clara fue considerada como una reacción positiva, una aglutinación débil después de 5 min, se consideró una reacción negativa; como controles negativos se utilizaron las suspensiones antigénicas mezcladas con suero no inmune de conejo y con PBS.

Ensayo Dot Blot

El ensayo Dot Blot se realizó siguiendo básicamente la metodología descrita por Santos y col (1995). Sobre membranas de ésteres de celulosa (Millipore), previamente humedecidas en PBS y secadas al aire, se depositó 1 µl de suspensión de antígeno "O". Las

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

membranas se bloquearon en tampón Tris-salino (TBS, Tris-(hidroximetil)-aminometano 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7,5) suplementado con gelatina (Oxoid) al 3 % (p/v) (TBS-3) durante 30 min. Después de dos lavados con tampón TBS suplementado con Tween-20 (Sigma) al 0,05% (v/v) (TTBS), se incubaron con el antisuero de conejo correspondiente diluido en TBS con gelatina al 1% (p/v) (TBS-1), durante 1 h en agitación. Después de tres lavados con TTBS de 15 min cada uno, las membranas se incubaron con anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulina G (IgG) de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (BioRad) diluído 1/3000 en TBS-1. Después de 1 h de incubación, se repitió la secuencia de lavados con TTBS durante 15 min. Las membranas se lavaron con TBS y se incubaron con una solución con tampón carbonato (0,1 M NaHCO3, 1,0 mM MgCl2 pH 9,8) conteniendo azul de tetrazolio (0,3 mg/ml) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (0,15 mg/ml)

El revelado se detuvo mediante baños en agua destilada. Sólo las reacciones de intensidad similar a las obtenidas con la cepa homóloga se consideraron positivas.

3.1.2.3. Identificación mediante métodos moleculares

La posición taxonómica de las cepas aisladas se confirmó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional y en tiempo real según los procedimientos descritos por Beaz-Hidalgo y col., (2008) y Fernández-Álvarez y col (2016 b), respectivamente. Para ello se utilizaron los cebadores específicos Fer 3-F (5´CGGTTTTGGCGCAGTGACG3´) y Fer4-R (5´AGGCGCTCGGGTTGGCTATCT 3´), descritos por Beaz Hidalgo y col. (2008) que amplifican una región de 422 pb del gen *fstA* de la especie *A. salmonicida* y los cebadores AsalaopO-FW (5′-AGCTCATCCAATGTTCGGTATT-3′) y Asal-aopORV (5′-AAGTTCATCGTGCTGTTCCA-3′) descritos por Fernández-Álvarez

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

y col (2016 b), que amplifican una región de 119 pb del gen *aopO* de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*. Para la realización de este ensayo se utilizó un termociclador MiniOpticon con el sistema de detección de software CFX Manager (Bio-Rad, California, USA.) y DNA bacteriano obtenido utilizando el sistema comercial Instagene (Bio-Rad®,USA). La concentración de DNA se determinó utilizando el fluorímetro Qubit 2.0 y el sistema comercial ADN BR de Qubit.

Las reacciones de PCR convencional se realizaron utilizando el sistema comercial Phire Hot Start II DNA polymerase siguiendo las instrucciones de la casa comercial. La concentración de los cebadores en la mezcla final (20 µl) fue de 150 nM. Como molde se empleó ADN extraído a partir de los cultivos bacterianos utilizando el sistema Instagene, BioRad). Las condiciones de amplificación incluyeron un paso inicial de desnaturalización de 3 minutos a 95ºC, 30 ciclos de desnaturalización de 30 segundos a 95ºC, y un paso hibridación durante 30 segundos a 60ºC.

En las reacciones de amplificación en tiempo real se utilizó el sistema comercial SYBR Green (Thermo Scientifics, Massachusetts, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante. La mezcla de reacción contenía 12,5 µl de Maxima SYBR Green qPCR Máster Mix, los cebadores (Fer3 y Fer4 o AsalaopO-FW y Asal-aopORV) a una concentración final de 150 nM, 1 µl del ADN molde y agua MiliQ hasta alcanzar el volumen final de 25 µl. Las condiciones de amplificación son idénticas a las descritas para la PCR convencional excepto que al final del último ciclo se incluyó una curva de desnaturalización con un rango de temperatura entre 65-95ºC. En todas las reacciones de PCR se han utilizado como controles positivos ADN de la cepa de referencia ATCC33658 de *A. salmonicida* spp. *salmonicida* y como control negativo agua desionizada estéril. El tamaño de los productos de amplificación obtenidos por PCR convencional y PCR en tiempo real se determinó mediante electroforesis (1 h a 100V) en un gel de agarosa

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

al 1,5% (p/v) suplementado con el colorante Redsafe (20.000x) (iNtRON Biotechnology, Seongnam-Si, Corea). Para determinar la masa molecular se incluyó en todas las electroforesis el marcador ADN GeneRuler de 100 pb (Thermofisher, CA, USA). La presencia de una banda con un tamaño de 422 pb y de 119 pb se consideró un resultado positivo para la identificación de la cepa a nivel de especie (*A. salmonicida*) y a nivel de subespecie (*A. salmonicida* ssp. *salmonicida*), respectivamente.

3.1.3. Caracterización molecular de los aislados

3.1.3.1.Obtención de lipopolisacáridos

La extracción de lipopolisacáridos (LPS) presentes en la envoltura celular de los aislados se realizó siguiendo básicamente la metodología de Hitchcock y Brown (1983). Para la obtención de LPS los aislados de *Aeromonas salmonicida* se cultivaron en medio TSA-1, se suspendieron en PBS a una densidad aproximada de 10^9 cél/ml (escala de McFarland) y se calentaron en un baño a 100°C durante 10 min. Posteriormente, se enfriaron en hielo y a continuación, se incubaron a 60°C durante 1h con 20 µl de una solución de Proteinasa K (Sigma) de 2,5 mg/ml en PBS.

La concentración de LPS de las muestras se determinó por el método de Keler y Novotny (1986) usando concentraciones crecientes (5-100 µg/ml) de lipopolisacáridos de *Vibrio cholerae* INABA 569B (Sigma) para la construcción de la curva patrón. Como reactivo se empleó la solución DMB cuya composición es: 0.016 g de 1,9 dimetilmetileno (Aldrich), 4.28 g de glicina, 3.33 g de NaCl, 47 ml de NaOH 1,0 N; 5 ml de etanol al 80% (v/v) en 1 l de agua destilada, pH 10,1. El ensayo se realizó añadiendo 2 ml del reactivo DMB a 100 µl de las muestras o de las soluciones patrón. La absorbancia de las

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

mezclas se leyó a 535 nm (A535).

El volumen de muestra analizada fue el equivalente a 20 µg de LPS. Las muestras se mezclaron con un volumen igual de TM 2X y se hirvieron durante 5 min antes de ser sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.

3.1.3.2.Obtención de proteínas de la envoltura celular

Para la extracción de proteínas totales de *Aeromonas salmonicida* los aislados se sembraron en matraces conteniendo medio TSC-1 utilizando un inóculo 1/100 de la cepa a analizar y se incubaron en agitación (200 rpm) durante 48-72 h. Las células se recogieron por centrifugación a 10 000xg durante 10 min a 4ºC y se suspendieron en 3 ml del tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 con 0,3% de NaCl. Las suspensiones celulares se sometieron a sonicación mediante 4-5 pulsos de 30 seg a 50 w, (Branson Sonifier 250); las muestras se mantienen en hielo picado, dejándolas reposar durante 30s entre cada pulso (para evitar la desnaturalización de las proteínas con el calor). La suspensión resultante se distribuyó en viales Eppendorf y se centrifugó a 12000xg durante 3 a 6 min para eliminar los restos celulares.

Los sobrenadantes se transfirieron de nuevo a dos viales de Eppendorf y se centrifugaron a 17.000xg durante 60 min a 4ºC. El sobrenadante resultante se desecha y el sedimento, compuesto por las proteínas de la envoltura celular, se suspendió en 50 µl de agua destilada estéril y se guardó a -20 ºC hasta su uso.

La suspensión de envolturas celulares totales se utilizó para el aislamiento de las proteínas localizadas en la membrana externa mediante la técnica de solubilización diferencial con el detergente lauryl sarcosinato sódico (Sarkosyl). Para ello se mezclan volúmenes iguales de la suspensión acuosa de envolturas celulares y de una

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

solución al 3% (p/v) de Sarkosyl en tampón Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. La mezcla se incubó durante 20 min a temperatura ambiente y las proteínas insolubles se recogieron por centrifugación a 17.000xg durante 60 min a 4ºC. El sedimento resultante se suspende en 75 µl de agua destilada y se almacena a -20 º C hasta su uso. El contenido proteico de las suspensiones de envolturas celulares totales y de las fracciones insolubles en Sarkosyl (proteinas de membrana externa), se determinó mediante el método de Bradford (Bradford,1976), usando concentraciones crecientes (5 a 100 µg /ml) de seroalbúmina bovina (Sigma) para la construcción de la curva patrón. Para estos ensayos se prepararon tubos con 100µl de soluciones de seroalbúmina y un tubo con el mismo volumen de agua destilada (tubo control) a los que se añadieron 5 ml del reactivo Bradford (Biorad). Las suspensiones de envolturas celulares se procesaron de la misma forma. Las mezclas se homogenizaron y se leyó su absorbancia a 595 nm no antes de 2 min ni después de 1 hora. La concentración de proteínas de las muestras se ajustó a 0,5 -1,0 mg/ml mediante dilución en agua destilada estéril.

3.1.3.3. Análisis electroforético de componentes de la envoltura celular

Las electroforesis se llevaron a cabo en geles discontinuos de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (poliacrilamida-SDS), siguiendo básicamente la metodología de Laemmli (1970). Los geles se prepararon a partir de las soluciones I [30% (p/v) acrilamida y 0,8 % (p/v) N,N´bis-metilen-acrilamida] y II [44% (p/v) acrilamida y 0,8 % (p/v) N,N´bis-metilen-acrilamida], para el gel concentrador y separador respectivamente. La composición final fue de 3% (v/v) acrilamida y 0,08% (v/v) bisacrilamida en tampón Tris-HCl 0,25 M pH 6,8 con dodecil-sulfato sódico (SDS) al 0,1 % (v/v) (gel concentrador) y 12,5% (v/v) acrilamida y 0,22% (v/v) bisacrilamida en tampón Tris-HCl 1,5 M pH 8,0 con SDS al 0,2 % (v/v) (gel separador). La polimerización de los geles se realizó por adición de TEMED (N, N, N, N'-tetrametil-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

etilendiamina) al 0,4% (v/v) (gel concentrador) y al 0,03% (v/v) (gel separador) y persulfato amónico al 0,02% (v/v) como agente catalizadore. El tampón de electroforesis utilizado fue Tris-Glicina [Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1 % (p/v); pH 8,3].

Inmediatamente antes de la electroforesis, las muestras se mezclaron con el tampón de muestra (TM) 2X {Tris-HCl 0,065 M, pH 6,8; SDS al 2% (p/v); glicerol 10% (v/v); azul de bromofenol 0,001 % (p/v) y 2–mercaptoetanol 5% (v/v)} en proporción 1:1 (v/v) y se calentaron a 100°C durante 5 min.

El volumen de muestra de LPS analizada fue el equivalente a 20 µg. El volumen de muestra analizada fue el equivalente a 50 µg de proteínas si se trataba de proteínas celulares totales y de 30 µg en el caso de las proteínas de membrana externa.

La visualización de los LPS en los geles se realizó por tinción con nitrato de plata según la técnica de Tsai y Frash (1982). Después de la electroforesis, los geles se fijaron en una solución con etanol al 40% (v/v) y ácido acético al 5% (v/v) durante 12 horas. A continuación, se oxidaron durante 5 min en una solución con etanol al 40% (v/v), ácido acético al 5% (v/v) y ácido peryódico al 0,7% (p/v). Los geles se lavaron 3 veces con agua destilada durante 15 min cada vez. Posteriormente, se mantuvo el gel durante 10 min en 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. Los geles se lavaron nuevamente tres veces en agua destilada (10 min cada vez). Después del último lavado, el agua se reemplazó por la solución reveladora (50 mg de ácido cítrico y 0,1 ml de formaldehido en 200 ml de agua). Cuando el gel adquirió una coloración marrón, la tinción se detuvo reemplazando el revelador por metanol al 50% (v/v).

Los geles de proteínas se tiñeron durante 2 horas con Azul Coomassie R-250 (Sigma) al 0,05% (p/v) en solución acuosa de isopropanol al 25 % (v/v) y ácido acético al 10 % (v/v). Para el desteñido se empleó una solución de metanol al 30 % (v/v) y ácido

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

acético al 10 % (v/v) en agua destilada.

Para evaluar las masas moleculares (MM) de las proteínas de los aislados, se incluyeron en todas las electroforesis los siguientes marcadores suministrados por BioRad: fosforilasa-B (97,4 Kilodaltons, Kd), seroalbúmina bovina (66,2 Kd), albúmina de huevo (45,0 Kd), anhidrasa carbónica (31,0 Kd), tripsinógeno (21,5 Kd) y lisozima (14,4 Kd). Las masas moleculares se estimaron mediante la recta de regresión definida por las distancias relativas recorridas por cada una de las proteínas patrón y el logaritmo decimal de su masa molecular expresada en Kilodaltons.

3.1.3.4. Transferencia electroforética y análisis inmunológico

El análisis de los componentes celulares antigénicos de los aislados de *Aeromonas salmonicida*, se llevó a cabo mediante transferencia electroforética a papel de nitrocelulosa de las muestras separadas en geles de poliacrilamida-SDS, seguida por la detección de los antígenos usando el antisuero-TO967.1.

Una vez separadas en geles de poliacrilamida-SDS, las muestras de lipopolisacáridos o de proteínas de membrana se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (0,45µm, BioRad) mediante electroforesis en una cubeta Transphor 2005 (pharmacia-LKB) a 30 V durante 16 a 18 horas en el tampón de transferencia Tris Glicina (TGS, BioRad).

Finalizada la transferencia, las membranas se incubaron durante 30 min en tampón Tris-salino (TBS,20mM, 500mM NaCl.pH7,5) conteniendo 3% (p/v) de gelatina (TBS-G3). A continuación, las membranas se lavaron 2 veces (5 min/cada vez) con tampón Tris-salino suplementado con Tween-20 (Sigma) al 0,05% (v/v) (TTBS) y se incubaron durante 1h con el antisuero o el suero no inmune (suero control) diluido 1/1000 en tampón TBS conteniendo un 1% (v/v) de gelatina (TBS-G1).

A continuación, se lavaron las membranas 2 veces con tampón TTBS y se incubaron durante 1h con sueros comerciales anti-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

inmunoglobulina G de conejo (IgG) conjugados con fosfatasa alcalina (Biorad) diluido 1/3000 en tampón TBS-G1. Las membranas se lavaron dos veces en TTBS y una vez en TBS y se incubaron hasta el desarrollo de color con tampón carbonato (0,1 M $NaHCO_3$, 1,0 mM $MgCl_2$ pH 9,8) conteniendo azul de tetrazolio (0,3 mg/ml) y 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato (0,15 mg/ml). El revelado se detuvo mediante baños de agua destilada (Milli Q).

3.1.3.5.Análisis del contenido plasmídico

El análisis del contenido plasmídico en las cepas aisladas se llevó a cabo por el método de Kado y Liu (1981). Este método se basa en la desnaturalización del ADN cromosómico por la acción de un detergente alcalino (SDS) a elevadas temperaturas.

Para obtener el DNA extra cromosómico las cepas se cultivaron en caldo TSC-1. Un volumen de 1,5 ml del cultivo en fase logarítmica se transfirió a viales Eppendorf y se centrifugó a 12.000xg durante 5 min, el sedimento resultante se suspendió en 60 µl de la solución de lisis (SDS al 3% en Tris 50 mM pH 12,4) y se incubó a 56 ºC durante 45 min. A continuación se adicionó un volumen igual (60 µl) de fenol:cloroformo (1:1, v/v) y se agita suavemente hasta formar una emulsión que se centrifuga a 12.000xg durante 5 min. Se recoge la fase acuosa superior, conteniendo el ADN plasmídico, y se transfiere a un nuevo vial mezclándolo con 10 µl de la solución estabilizadora (púrpura de bromocresol al 0,25 % en Tris-acetato 50 mM pH 7,9 y glicerol al 50 %).

La detección del DNA plasmídico se realizó por electroforesis (100v) en geles de agarosa al 0,7 % en tampón Tris–acetato (BioRad), suplementado con el colorante Redsafe (20.000x) (iNtRON Biotechnology, Seongnam-Si, Corea). Para determinar la masa molecular se incluyó en todas las electroforesis el marcador DNA GeneRuler de 100 pb (Thermofisher, CA, USA). El DNA plasmídico se

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

visualizó con un transluminador de luz UV.

3.1.3.6. Análisis del polimorfismo genómico

Amplificación al azar del polimorfismo del ADN (RAPD)

Con el fin de estudiar la existencia de polimorfismo a nivel del DNA genómico en nuestras cepas se ha empleado la técnica de RAPD (ramdom amplified polymorphic ADN). Con este fin se utilizaron los reactivos suministrados por Amersham Pharmacia Biotech, y que consistieron en un set de 6 cebadores de secuencia arbitraria (RAPD Analysis Primer Set) y los viales (RAPD Analysis Beads) conteniendo todos los componentes necesarios para la reacción (TAQ polimerasa, dNTP, BSA y tampón de reacción). Tras la adición a los viales de la cantidad indicada por el fabricante de agua destilada, cebador y DNA molde, se llevó a cabo la reacción de amplificación en un termociclador Mastercycler personal (Eppendorff). El programa consistió en 45 ciclos de 1 minuto a 95°C (desnaturalización), 1 minuto a 35°C (unión del primer) y 1 minuto a 72°C (polimerización), además de 4 minutos de desnaturalización iniciales a 95°C y 10 minutos finales de extensión a 72°C.

La detección de los fragmentos de PCR se realizó por electroforesis a un voltaje constante de 100 voltios, empleando geles de agarosa al 1,2

% en tampón Tris–acetato suplementado con el colorante Redsafe (20.000x) (iNtRON Biotechnology, Seongnam-Si, Corea). Para determinar la masa molecular se incluyó en todas las electroforesis el marcador 50-2000 pb (Sigma, St. Louis, MO, USA). Las bandas de ADN se visualizaron con un transluminador. Los patrones de bandas de RAPD se analizaron utilizando el paquete de software BioNumerics versión 4.61 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). Las similitudes entre los aislados se estimaron mediante el coeficiente de Dice (Sd). El análisis de conglomerados y los dendrogramas se

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

realizaron mediante el método de grupos de pares no ponderados con medias aritméticas (UPGMA).

Ribotipado

Se ha utilizado la metodología descrita por Pedersen y Larsen (1994). Para la digestión de las muestras de ADNse utilizaron las enzimas de restricción Hind III y Eco R1 siguiendo las instrucciones del fabricante (Boerringer Marinheim). El ADN digerido se sometió a electroforesis (110 v) en geles de agarosa (tipo II, Sigma) al 1% (p/v) en tampón TAE (BioRad). Finalizada la electroforesis los fragmentos de ADN se transfirieron a membrabas de nylin (Hybon-N, Amershan) mediante vacío (Hybaid Vacu-Aid), se fijaron con luz ultravioleta (Ultraviolet Crosslinker, Amershan Life Science) y se hibridaron con una sonda de ADN obtenida a partir del ARNr (16S+23S) de Escherichia coli mediante transcripción a ADNc catalizada por la transcriptasa reversa del virus de la leucemia Moloney de ratones (MMLV, Gibco), cebadores arbitrarios y una mezcla de hexanucleótidos marcados con digoxigenina (Boerhinger Mannheim).

Las membranas se incubaron con una solución de antisuero anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (Boerhinger Mannheim) y se revelaron por incubación con azul de tetrazolio (75 mg/ml) en dimetilformamida al 70% y 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (50 mg/ml) en dimetilformamida.

3.1.4. Estudio de la virulencia y factores asociados

3.1.4.1. Virulencia para peces

Los ensayos de virulencia se realizaron mediante inyección intraperitoneal. Para la realización de este estudio se utilizaron las cepas ATCC14174, L9R1, L9R2, L3S1, L10S1, TO967.1. Las cepas bacterianas se cultivaron en agar TSA-1 durante 48 horas a 22ºC y se

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

suspendieron en solución salina a una concentración equivalente al tubo 3 de la escala MacFarland). El número de bacterias viables se determinó por siembra en placa de diluciones seriadas de la suspensión inicial y recuento del número de colonias producidas. La infección experimental se realizó en alevines de trucha arcoíris (10±2,0 g) y rodaballo (25±2,2 g). Los peces se anestesiaron con MS222 (Sigma) (100 mg/ml) y se inyectaron con 0,1 ml de la suspensión bacterias. Los peces se mantuvieron en agua dulce (truchas) y en agua de mar filtrada (rodaballos) a una temperatura de 16ºC con aireación. Los peces se alimentaron "ad libitum" con pienso comercial. El mantenimiento de los peces durante todo el período experimental fue realizado por los técnicos especializados del animalario.

Las mortalidades producidas a lo largo del período experimental (15 días) se consideraron causadas por la bacteria inoculada sólo si se aislaba o se detectaba mediante PCR el microorganismo en muestras de los órganos internos de los peces muertos. Con este fin, se tomaron muestras de riñón anterior y bazo con asa de siembra estéril y se sembraron en placas de medio BHI. Además, se extrajeron fragmentos del riñón anterior y del bazo y se conservaron en alcohol al 70%, para la posterior detección de la bacteria mediante PCR.

3.1.4.2. Actividades de los productos extracelulares

Para la obtención de los productos extracelulares (ECPs) se utilizó la técnica sobre membranas de celofán según se describió (Santos y col, 1991a). El contenido proteico de los ECPs se determinó mediante el método de Bradford como se describió previamente. Las actividades enzimáticas generales se evaluaron usando el sistema API ZYM (BioMerieux). La galería se inoculó e interpretó siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Las actividades caseinasa y gelatinasa se evaluaron en placa por el método de difusión radial. La toxicidad de los ECP de las bacterias en estudio se determinó *in vitro*,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

mediante exposición de líneas celulares de peces, e *in vivo*, mediante inyección de los ECPs en trucha y rodaballo. La actividad citotóxica se evaluó en las líneas celulares de cultivo continuo de peces EPC (derivada de piel de *Pimephales promelas*), CHSE (derivada de embrión de salmón Chinook, *Oncorhynchus tshawytscha*), y RTG-2 (línea celular derivada de gónada de *Oncorhynchus mykiss*). Las células se mantuvieron rutinariamente en frascos de cultivo celular (25 cm2), utilizando el medio esencial mínimo tamponado con solución de Earle (E-MEM) suplementado con 10% suero fetal de ternera y antimicrobianos (penicilina 100 UI/ml y estreptomicina 100 μg/ml) y las temperaturas óptimas de cada tipo celular (CHSE y RTG-2, 18ºC, EPC, 25ºC). Para el ensayo de citotoxicidad las células se cultivaron como monocapa confluentes en placas de 24 pocillos de fondo plano (Costar) en medio E-MEM suplementado con suero y antimicrobianos. Inmediatamente antes de realizar el ensayo se cambió el medio de cultivo de los pocillos por medio fresco y se inocularon 0,1 ml de los diferentes ECP. Como control se añadió 0,1 ml de solución salina estéril. Las placas se incubaron a 22ºC durante un periodo de 72h, examinándose periódicamente en un microscopio invertido (Olympus). La existencia de destrucción total o parcial de los tapices se consideró indicativo de efecto citopático. Para determinar si los productos extracelulares producían pérdida de la viabilidad celular, finalizado el ensayo, se eliminó el medio de cultivo, se lavaron las células tres veces con solución salina estéril y se añadió un derivado del tetrazolio, el 3[4,5- di-metiltiazoil-2-il] 2,5-bromuro de difeniltetrazolio (MTT, 5 mg/ml), compuesto que es reducido por las deshidrogenasas celulares adquiriendo un color púrpura. La toxicidad en peces se evaluó mediante inyección intraperitoneal de 0,1 ml de los ECPs en trucha y rodaballo. Los peces inoculados se examinaron durante un período de una semana, anotándose cualquier indicio de lesión o mortalidad.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.1.4.3. Evaluación de la capacidad de adherencia

La capacidad de adherencia de las cepas en estudio se evaluó mediante ensayos de aglutinación utilizando eritrocitos de rodaballo y humanos según la metodología descrita por Santos y col (1991b). Las células bacterianas se suspendieron en solución salina y se ajustaron a una densidad aproximada de 10^9 células/ml por comparación de su turbidez con el tubo 3 de la escala MacFarland. La sangre de rodaballo y humana se obtuvo por punción venosa utilizando jeringuillas heparinizadas, Inmediatamente antes de su uso los eritrocitos se lavaron por centrifugación (3000xg) y se suspendieron al 3% en solución salina estéril.

Los ensayos de hemaglutinación se realizaron mezclando volúmenes iguales (20µl) de las suspensiones bacterianas y de las suspensiones de eritrocitos. Las cepas se consideraron aglutinantes si la agregación se producía antes de 10 minutos. Como controles negativos de autoaglutinación se utilizaron mezclas 1:1 de eritrocitos: solución salina y de células bacteriana: solución salina.

3.2. RESULTADOS

3.2.1. Caracterización taxonómica de las cepas estudiadas

Las cepas utilizadas en este estudio fueron aisladas durante el período comprendido entre 1996 y 2018, en epizootias de furunculosis ocurridas en distintas piscifactorías españolas (Tabla 4). Estas cepas fueron aisladas a partir de órganos internos (hígado, riñón, bazo) y lesiones externas de los peces. En base a las pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas todas las cepas fueron identificadas como *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*. Los aislados mostraron una gran homogeneidad en las características fenotípicas (Tabla 6).

Todos los aislados mostraban como características comunes el ser cocobacilos, Gramnegativos, inmóviles, aeróbicos facultativos,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

oxidasa, catalasa y rojo metilo positivos, que reducen los nitratos y resistentes al agente vibriostático 0/129 (pteridina). En cambio, las cepas eran negativas en las pruebas de Indol y Voges-Proskawer. Además, la mayoría de las cepas mostraban una alta capacidad hidrolítica para los substratos gelatina, caseína, tirosina, almidón y DNA (Tabla 6). La prueba de producción de ácidos a partir de carbohidratos resultó positiva para la mayoría de los compuestos evaluados (Tabla 6). Además, los aislados crecían en un rango de temperaturas comprendido entre 4ºC y 30ºC y no tenían un requerimiento absoluto de sal lo que explica su crecimiento en medio carente de NaCl (Tabla 6).

La evaluación del API-20E en cepas de *Aeromonas salmonicida* reveló la existencia de reacciones falsas negativas sólo para la fermentación de manosa. El perfil numérico del índice API predominante el 2006104 que identificaba a los aislados como *A. salmonicida*. Estos resultados parecen indicar que el sistema miniaturizado API 20 E puede ser utilizado rutinariamente para la identificación de cepas de *A. salmonicida* aisladas a partir de especies de peces cultivadas en agua de mar. La Figura 9 muestra el perfil característico de *A. salmonicida* en API 20E. El uso del programa ABIS online permitió identificar a todos los aislado a nivel de especie y a un notable número de cepas a nivel de subespecie.

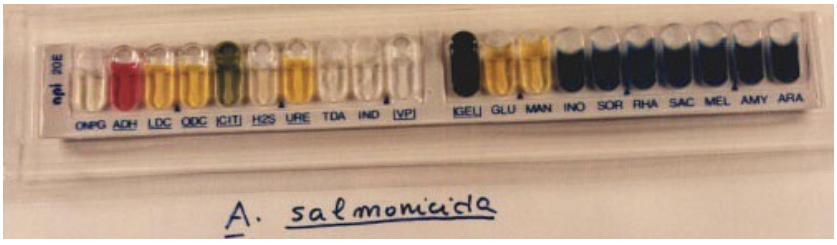


Figura 9- Perfil característico de A. salmonicida en API-20E.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 6. Caracterización fenotípica y bioquímica de las cepas aisladas en el presente estudio.

Carácter	**Cepas en estudio (n= 50)**	**Cepas de referencia (n=5)**
Morfología	cb	cb
Gram	-	-
Movilidad	-	-
Pigmento	+	+
0/129	-	-
Oxidasa	+	+
Catalasa	+	+
Indol	-	-
VP	-	-
R.M	+	+
Citrato	-	-
Nitrato	+	+
Tabla 7		
Degradación de:		
Gelatina	+	+
Esculina	+	+
DNA	+	+
Tirosina	+(28)	-(1)
Almidón	+	+
Caseína	+	+
Crecimiento a:		
4ºC (72h)	+(11)	+ (1)
15ºC (24h)	+	+

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Crecimiento a:		
30ºC (24h)	+	+
34ºC	+	+
37ºC	-	-
42ºC	-	-
Crecimiento en:		
0 % NaCl	+	+
1 % NaCl	+	+
3 % NaCl	+	+
5 % NaCl	-	-
10% NaCl	-	-
Descarboxilación de:		
Arginina	+	+
Lisina	(+)	(+)
Ornitina	-	-
Carácter O/F	+/+	+/+
Ácido de:		
Glucosa	+	+
Arabinosa	+ (13)	-
Sacarosa	-	-
Maltosa	+ (16)	+
Manosa	+	-
Manitol	+(11)	+
Sorbitol	-	-/-
Inositol	-	-
Lactosa	-	-
Galactosa	+	+

cb: coco-bacilo, **+**, positivo; **-** negativo; **(+)** positivo debil; **R.M**, rojo metilo; **V.P**,Voges-Proskauer, **+/+**:facultativo, **+/-** oxidativo y no fermentativo, **-/-**: no oxida ni fermenta el compuesto.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El estudio de la susceptibilidad de *Aeromonas salmonicida* a diferentes agentes quimioterápicos, mediante la técnica de difusión en placa, reveló la existencia de patrones muy similares entre los aislados. Todos los aislados fueron sensibles a la flumequina y la mayoría a la ampicilina, enrofloxacina y florfenicol. Se detectó un elevado número de cepas resistentes a las sulfamidas potenciadas y a la oxitetraciclina y en menor proporción al cloranfenicol.

3.2.2. Caracterización serológica

Para la caracterización serológica de los aislados se realizaron ensayos de aglutinación en portaobjetos y "Dot-blot" utilizando antisueros obtenidos en conejos frente a las cepas de *A. salmonicida* TO967.1 y NCIMB 2261. Los resultados de estos ensayos permitieron corroborar la pertenencia de las cepas estudiadas a la especie *A. salmonicida* ssp *salmonicida*. e indican que, independientemente de su origen, todos los aislados presentan antígenos comunes (Figura 10 y Tabla 7). Es interesante señalar que sólo el método Dot blot permitió la caracterización serológica de las cepas auto aglutinantes.

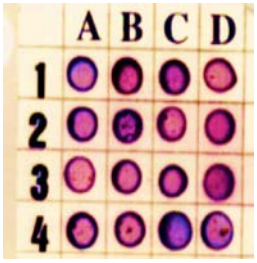
3.2.3. Caracterización molecular

3.2.3.1. Identificación de los aislados mediante PCR

La amplificación mediante (PCR convencional y en tiempo real utilizando los cebadores descritos por Beaz-Hidalgo y col (2008) permitieron confirmar la pertenencia de todas las cepas probadas a la especie *A. salmonicida*, observándose en todos los casos un producto de amplificación con una masa molecular de 422 pb (dato no mostrado) y una temperatura de desnaturalización **(**Tm**)** de 87,5±0,5ºC (Figura 11).

En base a este análisis no se ha podido diferenciar la subespecie típica (*salmonicida*) de las atípicas (*achromogenes, masoucida y smithia*.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



	A	B	C	D
1	ATCC 14174	ATCC 33658	MT004	416
2	SK112/06	SK197/06	379/05	SK401/06
3	SK215/06	TO932.1	TO96 7.1	IAs06 . 1
4	IAs 07.1	L9S1	L9R 2	L3R

Figura 10. Ensayo DOT Blot utilizando el antígeno "O" y suero frente a la célula completa de la cepa TO967.1.

Tabla 7. Reacciones obtenidas por la técnica de aglutinación en portaobjetos y "Dot-blot" usando el antígeno "O" y los sueros anti- TO 96.7.1 y anti-NCIMB2261.

Cepas	Aglutinación	Dot Blot
Cepas de referencia (n=5)	NA*	+
Cepas de estudio (n=50)	+ (28)	+

+, reacción positiva con el antisuero; -, reacción negativa con el antisuero; NA: Test no aplicable porque las cepas son autoaglutinantes.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

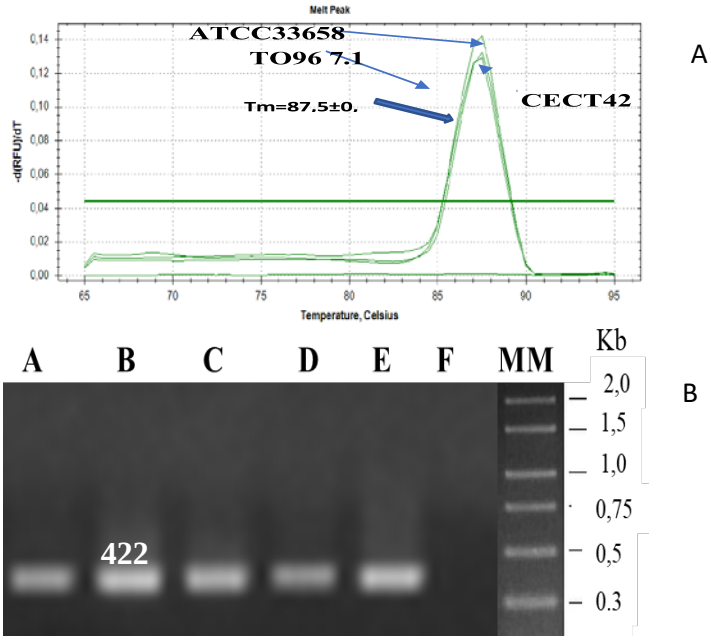
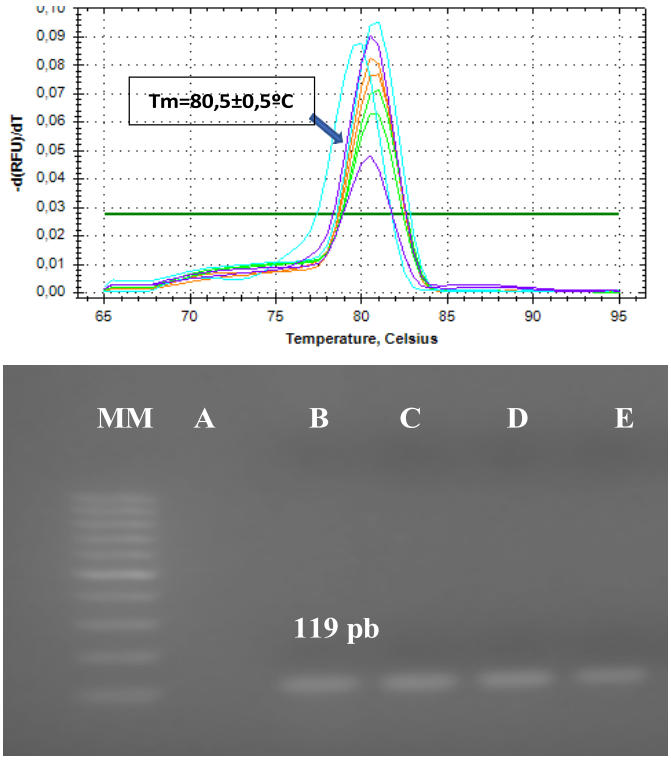


Figura 11. Temperatura de desnaturalización (Tm) (A) y tamaño de los amplicones (B) obtenidos usando los cebadores Fer 3 y Fer 4.
Lineas: A, B y D, aislados clínicos, C, ATCC33658; F, control negativo.

En cambio, la amplificación mediante PCR con los cebadores AsalaopO-FW y Asal-aopORV **(**Fernández-Álvarez y col, 2016), y el ADN de los 50 aislados clínicos y de las 5 cepas de referencia de *A. salmonicida* ssp. *salmonicida* se obtuvo un amplicón con una masa molecular de 119 pb y una Tm de 80,5±0,5ºC (Figura 12), confirmando la pertenencia de las cepas en estudio a la subespecie *salmonicida*.



A

B

Figura 12. Tm (A) y tamaño (B) de los amplicones obtenidos con los cebadores AsalaopO-FW y Asal-aopORV. Lineas: A, control negativo, B a D, DNA cepas en estudio; E, DNA ATCC33658.

3.2.3.2. Análisis de los componentes de la envoltura celular

El análisis de las proteínas de la envoltura celular (Figura 13) demostró que, con independencia de su origen, las cepas de *A. salmonicida* ssp. *salmonicida* presentan un perfil similar con bandas en un rango entre 12 y 156 kDa, con tres bandas mayoritarias de 30, 49 y 52 kDa. El análisis inmunológico utilizando el antisuero frente a la cepa TO967.1 confirmó la existencia de homogeneidad serológica entre los

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

aislados de *A. salmonicida* ssp. *salmonicida* (dato no mostrado).

El análisis mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS de los lipopolisacáridos (LPS) de la envoltura celular de las cepas estudiadas (Figura 14 A) puso de manifiesto que los LPS de las cepas de *Aeromonas salmonicida* ssp *salmonicid*a presentan un grupo de bandas de baja masa molecular (Lípido A y núcleo central) y otro de alta masa molecular constituido por las unidades polisacarídicas repetetivas de la cadena lateral "O". La Figura 14B muestra el resultado del análisis inmunológico de los LPS. Se observó una gran homogeneidad inmunológica en los patrones de LPS de las cepas de *Aeromonas salmonicida,* no detectándose ninguna diferencia en función del origen geográfico o la especie de pez a partir de la cual fueron aisladas las cepas.

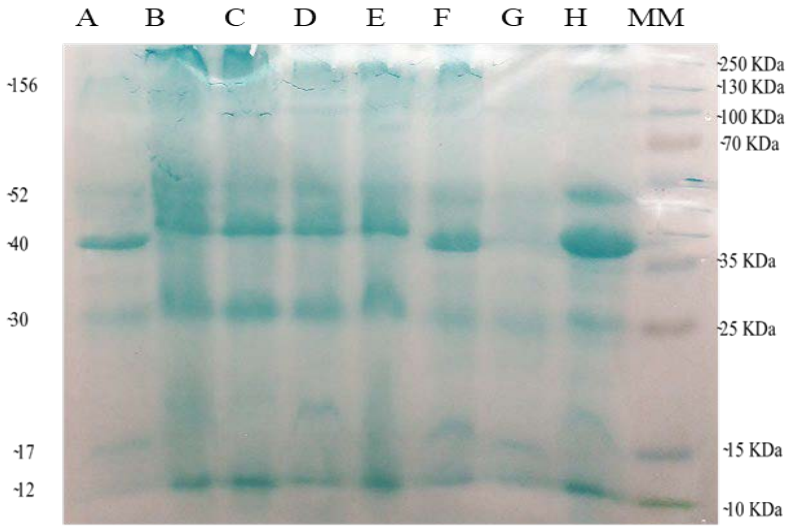


Figura 13. Análisis electroforético de proteínas de la envoltura celular. Líneas: A, ATCC33658; B, CECT4235; C, SK401/06.1; D, SK197/06; E, TO96.7.1; F, SK181/12; G, SK43/18; H, L3R, MM, marcador de masa molecular.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

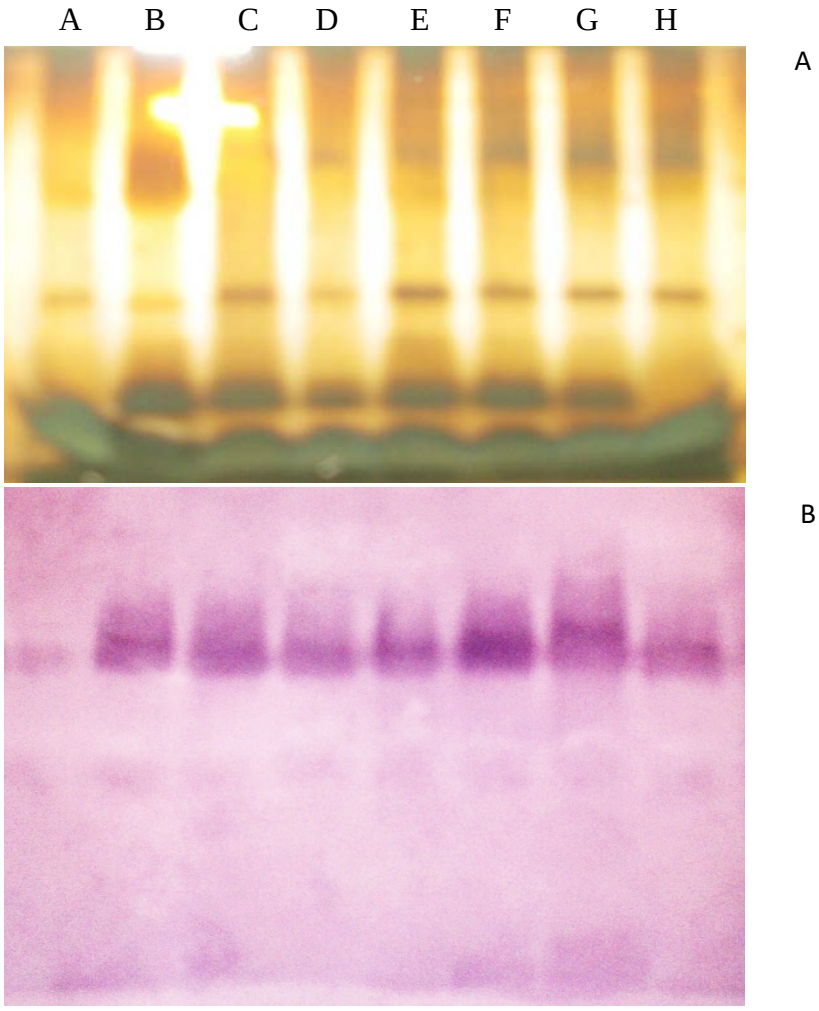


Figura 14 Análisis electroforético (A) e inmunológico (B)de los LPS de la envoltura celular. Líneas: A, ATCC33658; B, CECT4235; C, SK401/06.1; D, SK197/06; E, TO96.7.1; F, SK181/12; G, SK43/18; H, L3R, MM, marcador de massa molecular.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2.3.3. Análisis del contenido plasmídico

La mayoría de las cepas analizadas portaban cuatro plásmidos pequeños de 5,7, 4,9, 4,8 y 4,7 Kb, con independencia de su origen. Dos cepas aisladas de *S. salar* (SK112/06) y *S. trutta* (379/05) cultivadas en España carecen del plásmido de 5,7 Kb y una cepa (416) aislada de *S. salar* cultivada en Escocia contiene un plásmido de 9,6 Kb en lugar del plásmido de 5,7 Kb comúnmente encontrado en este estudio. En la cepa de referencia ATCC 14174 se detectó un gran plásmido adicional de 75,2 Kb.

3.2.3.4. Determinación del polimorfismo del ADN genómico

Amplificación al azar del polimorfismo genómico

El análisis del ADN cromosómico de los aislados mediante la técnica de RAPD, usando los cebadores RAPD1 y RAPD4, reveló la existencia de heterogeneidad a nivel genómico en la especie *Aeromonas salmonicida* ssp *salmonicida* (Figura 15 y Figura 16). Los patrones obtenidos con el cebador RAPD1, designados como tipos I a VI (Figura 15) mostraron entre 4 a 8 bandas con una masa molecular que oscilaba entre 500 y 3.000 pares de bases (Figura 15). Estos perfiles se agruparon en 2 grupos genéticos con una similitud del 57,6% (Figura 15). El grupo 1 contenía todas las cepas aisladas de lamprea de mar en España (perfiles II y V) y de rodaballo en Portugal (perfil II) agrupadas a un nivel de similitud del 85,7%. La cepa SK401/06 (perfile VI), aislada de *O. mykiss*, mostró un porcentaje de similitud inferior al 70% con las demás cepas del genogrupo 1. El genogrupo 2 contenía todas las cepas aisladas de rodaballo en España (perfiles III y IV) y la cepa de referencia NCIMB 2261 (perfil I), aislada de salmón del Atlántico, que se agrupaban a un nivel de similitud del 73,3%.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

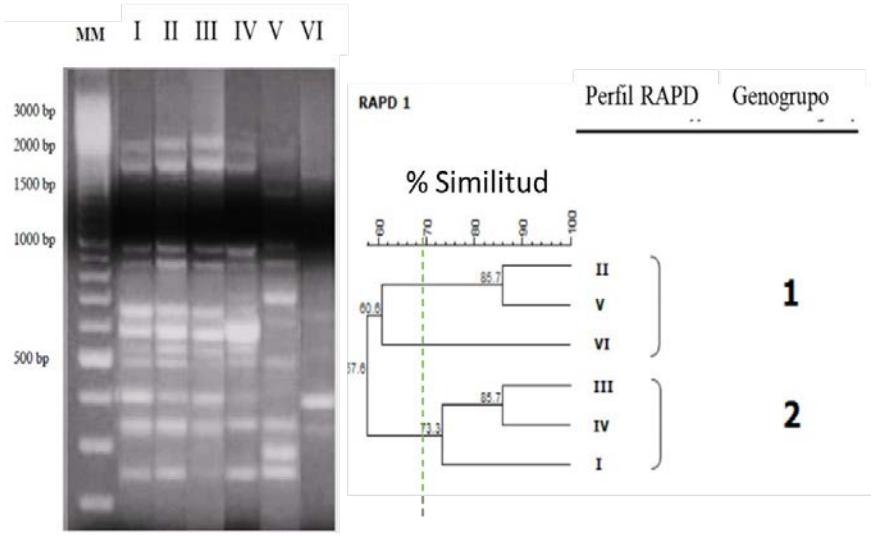


Figura 15. Perfil RAPD y genogrupos de A. salmonicida subsp salmonicida establecidos con el método de agrupamiento UPGMA y el coeficiente de Dice en base a los perfiles obtenidos con el cebador RAPD 1. Se incluye una línea discontinua que denota un hipotético nodo de similitud del 70% basado en RAPD para facilitar el análisis comparativo.

Los patrones obtenidos con el cebador RAPD4, designados como tipos I a VI (Figura 16) mostraron entre 3 y 12 bandas con un peso molecular que oscilaba entre 250 y 2.500 pares de bases (Figura 16). El análisis de la secuencia generada con el cebador RAPD4 permitió la diferenciación de tres grupos genéticos (1,2 y 3) con un nivel de similitud del 46,1% (Figura 16). El grupo 1 contenía cepas aisladas de rodaballo en España (perfiles II, III y VI), 1 cepa aislada de lamprea (perfil V), 2 cepas aisladas de trucha común y las cepas SK401/06, aislada de trucha arcoíris, y SK215/06, aislada de rodaballo (perfil VI). El grupo 2 reunía las restantes cepas aisladas de lamprea de mar (perfil IV). El grupo 3 incluía las cepas aisladas del rodaballo en Portugal y las cepas NCIMB 2261, MT004 y SK112/06 aisladas de salmón del Atlántico (perfil I)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

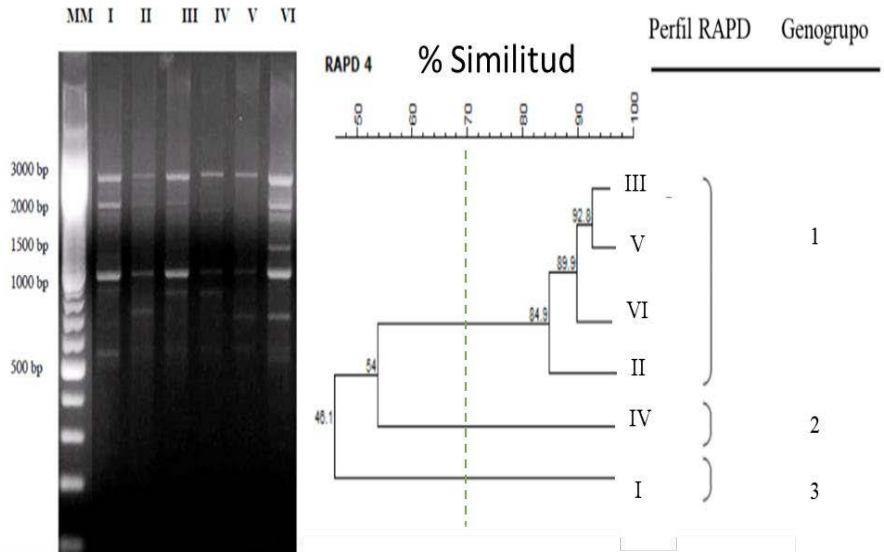


Figura 16. Perfil RAPD y genogrupos de A. salmonicida subsp salmonicida establecidos con el método de agrupamiento UPGMA y el coeficiente de Dice en base a los perfiles obtenidos con el cebador RAPD 4. Se incluye una línea discontinua que denota un hipotético nodo de similitud del 70% basado en RAPD para facilitar el análisis comparativo.

Ribotipado

Los resultados del análisis de ribotipado (Figura 17), basado en los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (Hind III) de secuencias genómicas codificantes del ARN ribosomal, pusieron de manifiesto que, con independencia de la fuente de aislamiento, las cepas de *A. salmonicida* ssp. *salmonicida* en estudio presentaban ribotipos similares.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

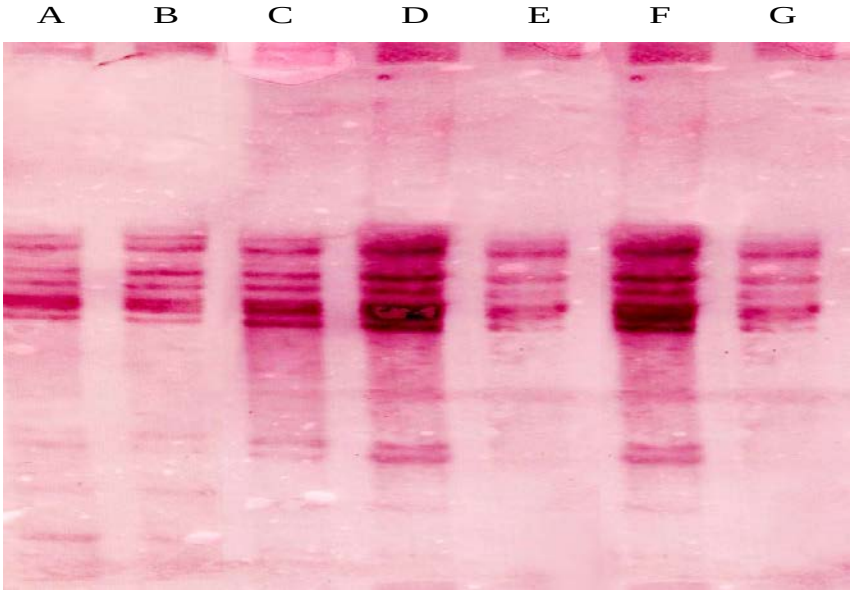


Figura 17. Ribotipos de A. salmonicida ssp salmonicida utilizando el enzima Hind III. Líneas: A y B, cepas de salmónidos; C a E, cepas rodaballo; F y G, cepas de lamprea.

3.2.4. Virulencia y factores celulares y extracelulares

La Tabla 8 muestra los resultados obtenidos en los ensayos de infección experimental utilizando como vía de infección la inyección intraperitoneal de trucha arcoíris y rodaballos. Las cepas de *A. salmonicida* produjeron mortalidad de los peces inoculados con dosis letales de 10^2 a 10^6 en trucha y 10^5 a 10^7 en rodaballo. La bacteria se recuperó en cultivo puro a partir de muestra de riñón anterior de los peces muertos o se detectó mediante PCR (dato no mostrado). Los resultados del ensayo de infección experimental parecen indicar que las cepas de *A. salmonicida* ssp. *salmonicida* carecen de especificidad de hospedador, siendo capaces de producir enfermedad en diferentes especies de peces.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En general, los productos extracelulares obtenidos a partir de las cepas de *A. salmonicida* ssp. *salmonicida* mostraron un contenido proteico moderado (0,05 a 0,06 mg/ml). Los ECPs producían destrucción parcial o total de los tapices celulares inoculados (Tabla 9; Figura 18), sin causar mortalidad de las células. Los ECPs mostraron además otras actividades enzimáticas como esterasa lipasa, leucina y valina arilamidasa, gelatinasa y caseinasa (Figura 19).

Con respecto a los factores celulares de virulencia evaluados, un número reducido de cepas mostraron capacidad para aglutinar alguno de los glóbulos rojos probados (humanos y rodaballo). La aglutinación utilizando eritrocitos humanos se muestra en la Figura 20.

Tabla 8. Infecciones en trucha arcoíris y rodaballo.

Cepa	Grado de virulencia	
	Trucha arcoiris	Rodaballo
ATCC14174	$10^{5,6}$	ND
379/05	10^{4}	10^{5}
L9R1	10^{6}	10^{7}
L9R2	$10^{5,6}$	ND
L3S1	10^{2}	10^{6}
L10S1	$10^{3,5}$	ND
TO967.1	10^{5}	$10^{5,5}$
IAS06.1	ND	10^{6}

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

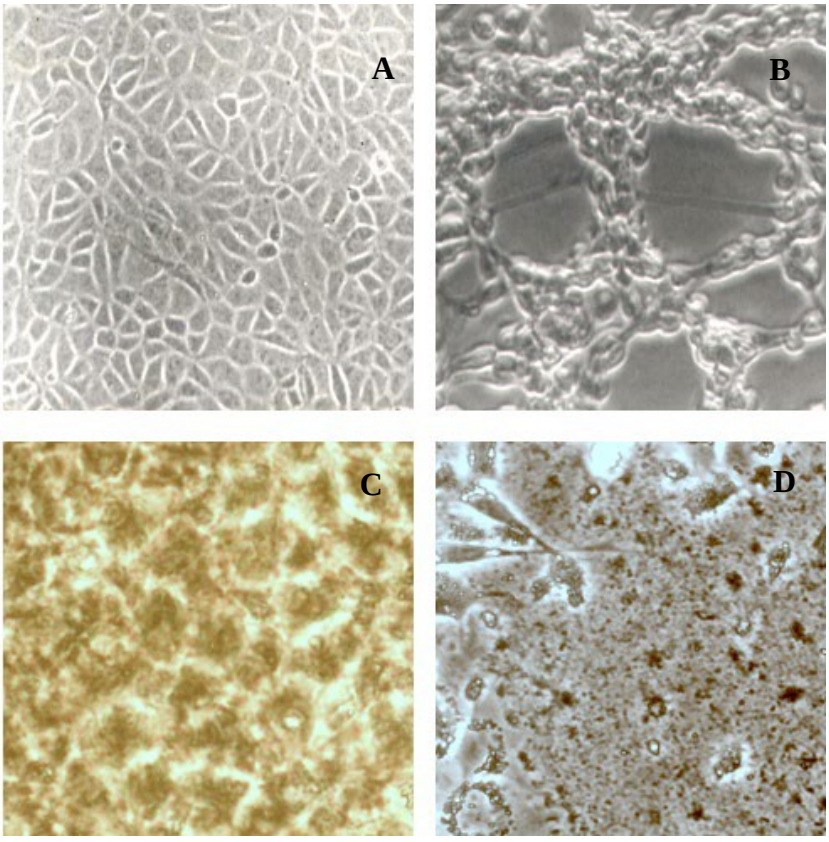


Figura 18. Efecto citotóxico producido por los productos extracelulares de A.eromonas salmonicida en las líneas de cultivo cotinuo CHSE y EPC. A, células CHSE control; B, destrucción parcial del tapiz celular; C, células EPC control y D, destrucción total del tapiz.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

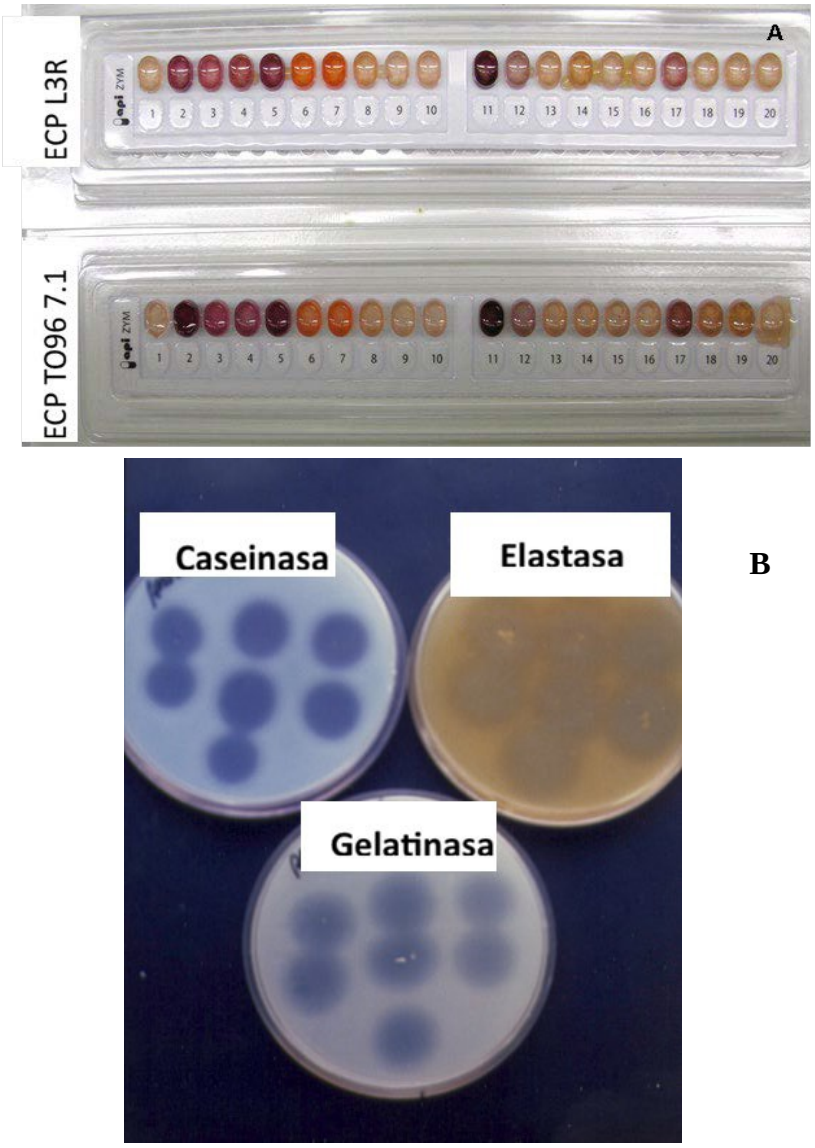


Figura 19. Actividades enzimáticas de los productos extracelulares de las cepas de A.salmonicida evaluadas utilizando el sistema API ZYM (A) y el método de difusión radial en placa (B)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 9. Capacidad hemaglutinante de las cepas de A. salmonicida y toxicidad de sus ECPs en cultivo celular.

Origen (nº de cepas)	Aglutinación		Citotoxicidad
	Humanos	Rodaballo	
Salmón atlántico, Escocia (3)	+	+	
	+ (2/3) *	Salmón atlántico,	
España (1)	-	-	
	+	Trucha común, España	
(2)	-	-	
	+	Trucha arcoiris, España	
(1)	-	-	
	+		
Rodaballo, España (15)	-	-	
	+ (10/15)	Lamprea (5)	
	+ (3/5)	-	
	+ (3/5)		

*Paréntesis, nº de cepas positivas/nº de cepas probadas.

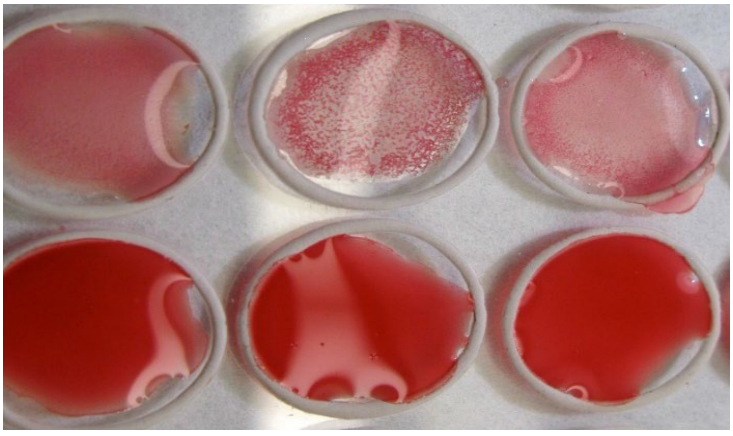


Figura 20. Aglutinación de eritrocitos humanos por Aeromonas salmonicida ssp. salmonicida.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.3. DISCUSIÓN

La identificación de una especie bacteriana sospechosa de ser la causa de una infección es una de las herramientas principales para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas, el establecimiento de tratamientos antimicrobianos eficaces y el control epidemiológico de la enfermedad. Clásicamente, el diagnóstico de enfermedades se ha basado en el aislamiento y la identificación de las bacterias aisladas en base a caracteres fenotípicos (crecimiento en los medios de cultivo, morfología del microorganismo aislado, propiedades fisiológicas y bioquímicas, capacidad de degradación de macromoléculas, presencia y tipo de enzimas respiratorias, requerimientos nutricionales, inhibición por compuestos antimicrobianos u otras sustancias) y reacción frente anticuerpos. La combinación de los resultados de los análisis fenotípicos y serológicos de las cepas bacterianas utilizadas en el presente estudio permitió la identificación de todos los aislados como

A. salmonicida ssp *salmonicida*. Con independencia de la fuente de aislamiento, todas las cepas presentaban características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas muy similares. El ensayo Dot Blot mostró que todas las cepas de *A. salmonicida* reaccionaron con los antisueros frente a las cepas NCIMB2261 aislada del salmón atlántico y de la cepa TO96.7.1 aislada del rodaballo. Los resultados obtenidos a lo largo del presente estudio concuerdan con los descritos por otros investigadores, corroborando la existencia de una homogeneidad a nivel de características fenotípicas en la especie *A. salmonicida* ssp. *salmonicida* (Austin y Austin, 2016; Toranzo y col, 1991; Fernández-Álvarez; 2018). Además, los análisis mediante PCR convencional y en tiempo real, utilizando los cebadores descritos por Beaz-Hidalgo y col, (2008) y Fernández-Álvarez y col, (2016b), permitieron confirmar la identificación de los aislados como *A. salmonicida* ssp. *salmonicida*,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

poniendo de manifiesto la utilidad de estos métodos en el diagnóstico de la furunculosis.

El análisis de la sensibilidad de *A. salmonicida* a compuestos antimicrobianos demostró la existencia de resistencia a oxitetraciclina, sulfamidas potenciadas y cloranfenicol. La existencia de cepas de *A. salmonicida* resistentes a antimicrobianos de uso habitual en acuicultura y la rápida adquisición de resistencia a antimicrobianos por este patógeno bacteriano ha sido ya descrita por otros investigadores en cepas aisladas en distintos países (Austin y Austin, 2016¸ Menanteau-Ledouble y col., 2016; Ortega y col, 2006). Además de la rápida aparición de resistencia a los agentes quimioterápicos por *A. salmonicida*, otro problema que complica el tratamiento de la furunculosis es el hecho de que la legislación de la UE (Reglamento UE 2019/6) regula el uso en acuicultura de antibacterianos existentes en el mercado y que son efectivos *in vitro* contra *A. salmonicida* ssp. *salmonicida*, con el fin de garantizar un alto nivel de protección de la salud pública, la sanidad animal y el medio ambiente.

El desarrollo de estrategias de prevención basadas en la inmunización requiere la identificación de las variantes antigénicas responsables de la enfermedad en un área determinada.

El análisis de los componentes de la envoltura celular de las cepas de *Aeromonas salmonicida* en estudio reveló una gran similitud en los patrones proteicos, no detectándose diferencias en función del origen geográfico o la especie de pez a partir de la cual fueron aisladas las cepas. Esta gran homogeneidad coincide con la descrita para cepas de esta misma especie por otros investigadores (Aoki y Trust, 1984, Aoki y Holland, 1985; Kitao y col, 1985). Además, la banda proteica de 49 Kd detectada en este estudio, es considerada como el componente principal de la capa A (Kay y col, 1981, Ishiguro y col, 1981).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Aunque Rockey y col (1991) han detectado cierto grado de heterogeneidad a nivel de los lipopolisacáridos en las cepas de *A. salmonicida* ssp. s*almonicida* utilizando antisueros monoclonales, las técnicas electroforéticas e inmunológicas convencionales utilizadas en el presente estudio no han permitido la constatación de estas diferencias. En conclusión, la homogeneidad detectada por métodos serológicos (ensayos de aglutinación en portaobjeto y "Dot blot") dentro de la especie *Aeromonas salmonicida* ssp *salmonicida,* concuerda con la similitud en los patrones de LPS y de proteínas de la envoltura celular, pudiendo hablar de la existencia de un único grupo antigénico dentro de la especie.

El desarrollo de una estrategia de control eficaz requiere el conocimiento de la epidemiología, así como la variabilidad genómica y virulencia de los aislados de *A. salmonicida* ssp. *salmonicida*.

Con respecto al análisis del genoma, el uso de la técnica de ribotipado demostró la existencia de homogeneidad a nivel genómico dentro de la especie, confirmando los resultados obtenidos por Nielsen y col (1994) e indican que la ribotipia, debido a su escaso poder discriminatorio, no es la técnica más adecuada para la tipificación epizootiológica de *A. salmonjcida* ssp. *salmonicida*.

El perfil de ADN basado en la amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD), ha demostrado ser un método muy útil para discriminar entre cepas de una especie (Power, 1996). En el presente estudio la aplicación de esta técnica demostró la existencia de diferentes perfiles genómicos. Estos resultados contrastan con los publicados por otros autores (Hanninen y col, 1995; Miyata y col, 1995) quienes empleando la misma técnica observaron una gran similitud a nivel genómico en la especie *Aeromonas salmonicida* ssp *salmonicida.* Además, el análisis de conglomerados corroboró la existencia de heterogeneidad dentro de la subespecie *salmonicida,* observándose la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

existencia de diferentes grupos genómicos sin relación con la especie de pez o área geográfica de aislamiento de las cepas. Estos resultados difieren de los obtenidos por O'hIci y col. (2000) quienes observaron una clara relación entre los grupos genómicos obtenidos mediante RAPD y el área de aislamiento de *A. salmonicida*. Estas discrepancias pueden deberse al uso de cebadores diferentes en los estudios de tipificación. Otra posibilidad es la existencia de diferencias reales a nivel genómico entre las cepas analizadas atribuibles en parte a la presencia de plásmidos que pueden actuar como diana para los cebadores RAPD, dando lugar a la amplificación de fragmentos de ADN que interfieran con el análisis de similitud (O'hIci y col. 2000). Además, las discrepancias observadas entre la tipificación de cepas por RAPD y ribotipado puede explicarse por el hecho de que estos métodos exploran diferentes tipos de polimorfismos de ADN. Así, el ribotipado se basa en el análisis de los genes del ARN ribosomal y los perfiles obtenidos (ribotipos o ribogrupos) se diferencian por el número y la localización de estos genes, mientras que el RAPD analiza los polimorfismos de secuencia de las regiones complementarias a los cebadores de amplificación y también polimorfismos de longitud de las regiones amplificadas.

Con respecto a la tipificación basada en el análisis de plásmidos, en este estudio se ha observado que el perfil plasmídico de las cepas de *A. salmonicida* ssp. *salmonicida* analizadas no difiere esencialmente del observado en las cepas de referencia aisladas en otras áreas geográficas. Este resultado sugiere que el análisis del perfil plasmídico no constituye una herramienta útil a nivel epidemiológico. Además, la tipificación basada en el análisis de los perfiles plasmídicos puede presentar ciertas dificultades de interpretación debido a 1) que los plásmidos pueden presentar diferentes conformaciones dependiendo del grado de superenrollamiento, 2) que un mismo plásmido puede presentar diferentes patrones de movilidad electroforética y 3) que plásmidos con

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

diferente secuencia de ADN pueden presentar tamaños muy similares que no se diferencian en electroforesis convencional. Además, el mismo plásmido en diferentes aislados puede estar sujeto a procesos de pérdida de ADN, como deleciones, o ganancia de otros elementos genéticos móviles, como transposones, integrones y secuencias de inserción. Todo ello, reduce el valor de este enfoque en la tipificación de *Aeromonas salmonicida* como indicaron Livesley y col (1999).

En la actualidad se han descrito muchos factores de virulencia de *A. salmonicida*, algunos de los cuales pueden ser utilizados para evadir los mecanismos de defensa del huésped y facilitar la infección (Reith y col., 2008; Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013; Dallaire-Dufresne y col, 2014). Sin embargo, no todos los factores de virulencia son igualmente importantes (Reith et al., 2008). De hecho, el mecanismo de virulencia de *A. salmonicida* ha demostrado ser un sistema complejo (Reith et al., 2008; Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013; Dallaire-Dufresne et al., 2014).

Uno de los factores de virulencia conocidos de *A. salmonicida* que juega un papel importante para la fijación y la entrada a las células del huésped son las adhesinas, la capa superficial y los pili (Austin y Austin, 2016; Reith et al., 2008). Sin embargo, sólo la capa A, que se asocia con los lipopolisacáridos (LPS) en la superficie celular, se ha descrito como un factor de virulencia importante de *A. salmonicida* (Austin y Austin, 2016; Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013). Las cepas que presentan capa A también tienen una alta proporción de aminoácidos hidrofóbicos; una propiedad que aumenta la hidrofobicidad de la superficie bacteriana, aumentando su capacidad para asociarse con los macrófagos, auto aglutinarse y adherirse al tejido del huésped. En el presente estudio, todas las cepas analizadas presentaron una proteína mayoritaria con una masa molecular de 49 Kda, similar a la descrita como componente de la capa A. Sin embargo, no todas las cepas mostraron capacidad auto aglutinante ni mostraron capacidad de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

adherencia, valorada en base a ensayos de hemaglutinación con eritrocitos humanos y de rodaballo. Otros factores de virulencia que se han señalado como importantes para la virulencia de *A. salmonicida* son los productos extracelulares (ECP). El análisis de los ECPs de las cepas de este estudio demostró la presencia de proteasas y citoxinas además de otras actividades enzimáticas generales. Estudios previos (Ellis y col, 1981) han demostrado que la actividad de proteasas, hemolisinas y toxinas promovían el desarrollo de lesiones en los peces como las detectadas en los peces afectados de furunculosis.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 4

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4. DESARROLLO DE HERRAMIENTAS PARA EVALUAR LA RESPUESTA INMUNITARIA DEL RODABALLO

4.1. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.1. Peces utilizados y condiciones de mantenimiento

Se utilizaron ejemplares sanos procedentes de piscifactorías de Galicia. Los peces se aclimataron en el acuario de la Facultad de Biología durante 15 días en tanques cuadrados (115x96x65cm) antes de su uso. Las condiciones de mantenimiento fueron: salinidad de 32‰, temperatura del agua de 16ºC±1 y caudal abierto de 15L/Kg/hora con aireación. Los peces se alimentaron "ad libitum" con pienso comercial.

4.1.2. Análisis del componente C3 del complemento

4.1.2.1. Obtención de plasma

La sangre se obtuvo a partir de rodaballos (250±50g) y truchas (150±50g) sanos mediante punción de la vena caudal utilizando jeringas heparinizadas estériles. La sangre humana se obtuvo por punción venosa. La sangre obtenida se centrifugó a 3000xg durante 10 minutos a 4ºC (centrífuga 3K30, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, EE. UU.) para separar el plasma de los restos sólidos. El plasma se distribuyó en viales de 1 ml cada uno y se mantuvo a una temperatura de -80ºC hasta su posterior uso.

4.1.2.2. Obtención de suero anti-C3 de rodaballo

El zimosan, una preparación de la pared celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que se une a las formas activadas del

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

complemento C3, es un modelo útil para analizar el mecanismo de activación del complemento. Tras la activación del complemento, la proteína C3 se deposita en las partículas de zimosan como fragmentos de C3b e iC3b. En nuestro estudio se ha utilizado este modelo para analizar la diversidad de C3 en rodaballo a nivel proteico.

El plasma de peces y humano se mezcló en proporción 1:1 con una suspensión de zimosan A (10 mg/ml) (Sigma-Aldrich, España) en tampón fosfato salino (PBS, pH 7,5) y se incubó durante 60 minutos a 25ºC. La mezcla se centrifugó a 4000xg durante 30 minutos (centrífuga Sigma 3K30), se eliminó el sobrenadante y el sedimento resultante se incubó durante 1 hora a 25ºC con el tampón Tris-HCl 125 mM (pH 6,8) que contenía 2% de SDS y 5% de 2-mercaptoetanol (Sigma. Aldrich, España) para eluir las proteínas que se habían unido al zimosan. Las proteínas obtenidas (ZC3) tras el tratamiento del plasma de rodaballo se utilizaron como antígeno para obtener un suero policlonal contra el componente C3 del rodaballo. Las proteínas del plasma de rodaballo, trucha y humano que se unieron al zimosan se analizaron mediante electroforesis en condiciones nativas y desnaturalizantes. Con fines comparativos en estos análisis se incluyó como control el componente C3 del complemento humano (Sigma).

El anticuerpo policlonal anti-ZC3 se obtuvo en conejos de raza Nueva Zelanda mediante inyección subcutánea de las proteínas ZC3 mezcladas (1:1) con adyuvante completo de Freund. Quince días después de la inmunización, se administró la dosis de refuerzo utilizando adyuvante incompleto de Freund. Una semana después de la última inyección, se extrajo sangre por punción cardiaca utilizando una jeringa estéril, se dejó coagular durante 2h a temperatura ambiente y se mantuvo a 4ºC durante 12h. Los sueros obtenidos se almacenaron a -30ºC hasta su uso.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.1.2.3. Purificación del componente C3 del complemento

El suero se concentró inicialmente por precipitación con polietilenglicol 8000 (Sigma) y luego se fraccionó por cromatografía de intercambio aniónico (CIA) seguida de cromatografía de filtración en gel (FX), según los procedimientos descritos (van den Berg, 2000; Lange y col, 2004a).

Para su concentración, el suero (de peces y humano) se diluyó 1/10 en PBS/EDTA 5mM/PEG 8000 al 4%, se incubó durante 30 minutos con agitación constante a 4ºC y se centrifugó (30min a 10.000xg). El sobrenadante se recogió en PEG 8000 al 10 %, se agitó durante 1 hora a 4 ºC, se centrifugó (30 min a 10 000xg) y el sedimento se disolvió en el volumen original utilizando Tris 20 mM, EDTA 5 mM (pH 7,5).

El fraccionamiento mediante cromatografía de intercambio aniónico (CIA) se realizó con una columna HiTrap Q HP de 1 ml (0,7 x 2,5 cm) (GE Healthcare Bio-Sciences AB). El fraccionamiento del plasma por CIA se realizó manualmente utilizando una jeringa conectada a la columna a través de un adaptador comercial. Para seleccionar las condiciones óptimas de pH para la fase móvil, las muestras de plasma se analizaron utilizando los tampones de inicio, elución y regeneración de la columna ajustados a pHs entre 5 y 9 con intervalos de 0,5-1 unidades de pH. Para la selección de las condiciones óptimas de fuerza iónica para la fase móvil se realizó un análisis similar variando la concentración de NaCl en un rango entre 0 y 0.5M con intervalos de 0.05 a 0.1M de la sal, manteniendo constante el pH de los tampones. La purificación se realizó siguiendo el procedimiento indicado por la casa comercial, realizando dos lavados previos con tampón de inicio (Tris 20mM, 0M NaCl) y tampón de regeneración (Tris 20mM, 1M NaCl) ajustado al pH seleccionado como óptimo (pH 7.5). Antes de inyectar la muestra, la columna se equilibró con el tampón de inicio.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El plasma de rodaballo concentrado se mezcló 1:1 con tampón de inicio con un inhibidor de proteasa comercial (0,1 M pefablock, Sigma), se centrifugó a 14.000xg durante 10 min y el sobrenadante resultante (1 ml) se inyectó en la columna de intercambio aniónico. A continuación, se recogió la fracción no retenida y se lavó la columna con 5 a 10 volúmenes de columna de tampón de inicio. La elución de la muestra se realizó con el mismo tampón utilizando diferentes concentraciones de NaCl y a una velocidad de elución de 1ml/min. En primer lugar, se eluyó con 5–10 volúmenes de columna de tampón inicial de NaCl 0,2 M, luego con 5–10 volúmenes de columna de tampón inicial de NaCl 0,3 M; 0,35 M; 0,4 M; 0.5M y finalmente con 5-10 volúmenes de columna con buffer de inicio con NaCl 1M, recolectando alícuotas de 0.5ml en cada paso. Estos eluatos se denominaron fracciones 0,2 M; 0,3 M; 0,35 M; 0,4 M; 0,5M y 1M.

Las fracciones de intercambio iónico, seleccionadas en base a su comparación con el componente C3 del complemento humano y su reactividad con suero anti-C3 de rodaballo, se mezclaron y se sometieron a una segunda etapa de separación mediante cromatografía de filtración en gel utilizando una columna Superdex™ 200 10 /300 GL (GE Healthcare Bio Sciences AB). La purificación se realizó como indica el protocolo comercial, equilibrando la columna primero con agua milliQ y luego con tampón de elución (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Pefablock 0,1 mM, EDTA 0,5 mM; pH 7,4). Se utilizó un sistema HPLC (HPLC SYSTEM 600, Konton AG) compuesto por un controlador, una bomba (Kontron), un monitor (UV – espectrofotómetro Uvicon 730 S LC, Kontron), un registrador gráfico y un colector de fracciones (FRAC-100) . El volumen de muestra cargado fue de 250 µl (3,22 µg de proteína), recogiendo una fracción cada minuto con un total de 30 fracciones, el volumen de cada fracción fue de aproximadamente 0,36 ml.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La concentración de proteína del plasma y de las fracciones de intercambio iónico y filtración en gel se determinó por el método de Bradford, utilizando concentraciones crecientes (50 a 1000 µg/ml/ml) de albúmina de suero bovino (Sigma) para la construcción de la curva estándar

Para medir la concentración de proteínas, las muestras (diluidas 1/10 con agua milliQ) se mezclaron con 5 ml de reactivo de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Canadá) y se dejaron incubar durante 5 minutos antes de leer la absorbancia a 595 nm (A_{595}) en un espectrofotómetro (Life Science UV/Vis Spectrophotomer DU® 730). La concentración de proteína de las muestras se ajustó a 1 mg/ml mediante dilución con agua miliQ estéril.

4.1.2.4. Análisis del componente C3 del complemento

Electroforesis desnaturalizante y nativa

La electroforesis se llevó a cabo en geles discontinuos de acrilamida-SDS poliacrilamida al 8%. Los geles y tampones se prepararon según el método de Laemmli (1970). Las muestras (plasma de rodaballo y fracciones de filtración de gel e intercambio iónico) para análisis en condiciones desnaturalizantes se mezclaron antes de la electroforesis con tampón 2X FSB [5 ml de TriS-HCl 0,25 M, pH 6,8; 0,4 g de dodecilsulfato de sodio (SDS) % (p/v); 2 ml de glicerol; 0,2 mg de azul de bromofenol y 2-mercaptoetanol] en una proporción de 1:1 (v/v) y se hirvieron durante 5 minutos antes de cargarlos en el gel. Para el análisis en condiciones no desnaturalizantes se usó tampón FSB sin el agente reductor (2-mercaptoetanol). El volumen de muestra analizado fue equivalente a 50 µg de proteína. La electroforesis se realizó en una cubeta vertical Mini Protean II (Bio-Rad Laboratories,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Hercules, Canadá) a 120 V durante 60 min utilizando tampón Tris glicina [Tris-(hidroximetil)-aminometano 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1% (p/v)] (Bio-Rad).

Tras la electroforesis, los geles se tiñeron con azul de coomassie [Coomassie® Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad) 0,05%(p/v), isopropanol (Panreac Química S.A.U, Barcelona, España) 25%(v/v) y ácido acético (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) 10% (v/v)] durante la noche. Se utilizó una solución de metanol (Panreac) al 30% (v/v), ácido acético (Merck) al 10% (v/v) y agua al 60% para teñir los geles. Para evaluar la masa molecular de las diferentes fracciones, se incluyó en la electroforesis un marcador de masa molecular (MM) (PageRuler TM Plus Prestained Protein Ladder #SM1811, Fermentas) con la siguiente escala en KDa: 250, 130, 95, 72, 55, 36, 28, 17 y 10. También se incluyó una muestra del componente C3 humano purificado (Sigma) en todas las electroforesis. Las masas moleculares de la muestra se estimaron con el software de análisis de gel 1-D Quantity One v. 4.6.5 (Bio Rad).

Las muestras (plasma de rodaballo y fracciones de filtración de gel e intercambio iónico) separadas en geles de poliacrilamida-SDS se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (0,45 µm, Bio-Rad) a 0,1 Å durante la noche en tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20 % (v/v), pH 8,3). Después de la transferencia, las membranas se bloquearon en tampón Tris-saline con gelatina al 3 % (TSX-3) (Oxoid Limited, Cambridge, Reino Unido) durante 60 min, luego se lavaron con tampón Tris-saline suplementado con Tween 20 (Sigma) al 0,5 % (TTBS) tres veces durante 5 minutos. A continuación, las membranas se incubaron con Anticuerpo anti-C3 de rodaballo obtenido en conejo diluido 1/1000 en tampón Tris con gelatina al 1% (TSX-1) (Oxoid) durante 1 hora. Posteriormente se lavó tres veces con TTBS y se incubó con suero comercial de cabra anti-inmunoglobulina G conjugado con fosfatasa alcalina (Bio-Rad) diluido 1/3000 en TSX-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1. Las membranas se lavaron nuevamente con TTBS tres veces durante 5 minutos y luego se revelaron con una solución que consistía en tampón de carbonato (0,1 M NaHCO3, 1 mM MgCl2, pH 9,8), azul de tetrazolio (Sigma) (0,3 mg/mL) y 5-bromo - Fosfato de 4-cloro-3-indolil (Fermentas International Inc., Ontario, Canadá) (0,15 mg/ml) durante 10 minutos, se detuvo el desarrollo lavando las membranas con agua destilada.

Digestión con proteasas

La digestión proteolítica del componente C3 del complemento se realizó utilizando las enzimas tripsina y papaína unidas a agarosa (Sigma), siguiendo básicamente el protocolo indicado por la casa comercial.

La digestión del componente C3 del complemento con tripsina se realizó en tubos eppendorf mezclando 60 µl de la fracción que contenía el componente C3 purificado, 60 µl del tampón de equilibrio (TrisClH 0,1 M, pH 8,0, Cl2Ca 10 mM) y 120 µl de la tripsina suspensión de enzimas – agarosa. Como control, se usó la misma mezcla reemplazando la suspensión de tripsina insoluble con agua milliQ estéril. Las mezclas se incubaron a 37ºC y se recogieron muestras de 20 µl a 2, 15, 30 y 60 minutos y 24 horas. Cada muestra recogida se centrifugó a 1000xg durante 2 minutos a 4ºC, recogiéndose el sobrenadante y congelándolo a -30ºC hasta su uso.

La digestión con papaína (Sigma) se realizó de la misma manera que con tripsina utilizando tampón de fosfato 20 mM, DTT 1 mM, EDTA 5 mM, pH 6,2 como tampón de equilibrio. Las muestras se mantuvieron congeladas hasta su uso.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Detección de carbohidratos en el componente C3

Se usó un sistema comercial de detección de glicoproteínas (Sigma) que detecta enlaces glucosídicos en geles SDS-PAGE tiñendo las bandas de carmesí y el gel de rosa claro. El sistema de detección es una modificación de la reacción de Schiff [ácido peryódico - reactivo de Schiff (PAS)]. El ácido peryódico oxida selectivamente el residuos de glucosa generando aldehídos que reaccionan con el reactivo de Schiff produciendo el color carmesí. El procedimiento se realizó conforme a las instrucciones del proveedor.

4.1.3. Optimización de un inmunoensayo doble indirecto

Para determinar los niveles de anticuerpos específicos frente a *A. salmonicida* ssp. *salmonicida* en el suero de rodaballo, se ha optimizado un inmunoensayo enzimático (ELISA) doble indirecto, modificando el procedimiento original descrito por Estévez (1994).

4.1.3.1. Obtención de antisueros

El suero frente a la cepa.TO967.1 (anticuerpo primario) se obtuvo en rodaballo (500±50g) mediante inyección intraperitoneal, siguiendo la metodología descrita por Hastings y Ellis (1988). Como antígeno se emplearon las células bacterianas de la cepa de *A. salmonicida* subs. *salmonicida* TO96.7.1 inactivadas con formaldehido como se describió en el apartado 3.1.2.2. Las células bacterianas inactivadas se inyectaron en rodaballo por vía intraperitoneal en dosis de 0,2 ml (Figura 21). Pasados 20 días se le administró una segunda dosis de 0,2 ml (dosis de recuerdo) por vía intraperitoneal. Se utilizaron lotes de 10 peces para la cepa bacteriana y 10 peces control que se inmunizaron con PBS. Al mes de administrar la segunda dosis se procedió al sangrado de los peces a través de la vena caudal. La sangre obtenida se dejó coagular a

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

temperatura ambiente durante 2 horas y 12 h a 4°C y se separó el suero de los restos sólidos por centrifugación a 10000xg durante 5 minutos a 4ºC. El suero se distribuyó en viales a razón de 1 ml y se mantuvo hasta su uso a -30°C.

Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo monoclonal específico frente a la inmunoglobulina de rodaballo obtenido en ratón (UR3) (Estévez, 1994) suministrado por el Dr. Florencio Martínez Ubeira, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela.

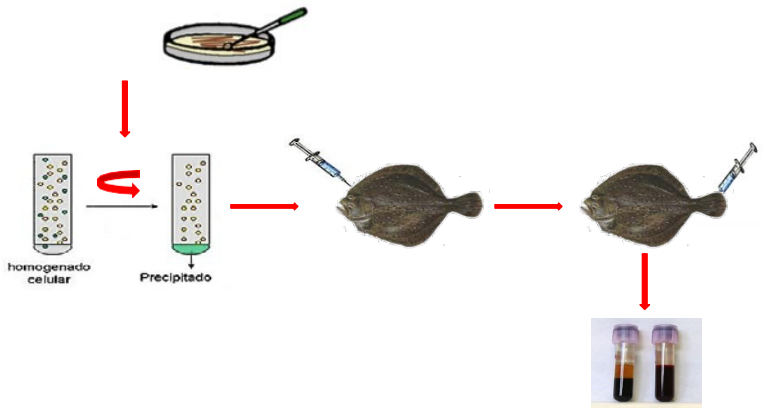


Figura 21. Obtención de suero anti-TO96.7.1 en rodaballo

4.1.3.2. Preparación de antígenos

Para la optimización de la técnica de detección de anticuerpos se evaluaron los siguientes tipos de antígenos:

Células bacterianas inactivadas con formol (CBF)

Las células inactivadas con formaldehido (CBF) de la cepa

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

TO96.7.1 se prepararon como se describió (3.1.2.2) y se ajustaron a una concentración de 10^9 cels/ml (tubo nº 3 de la escala McFarland).

Extracto crudo bacteriano (ECB)

Las células bacterianas se suspendieron en PBS (10^9 cels/ml) se sometieron a un tratamiento con ultrasonido (50-60 W, durante 3-4 min en pulsos de 40-45s) (Branson Sonifier Cell Disruptor 250, Branson Sony Power Co. Danbury, USA.), en condiciones de refrigeración. Las suspensiones obtenidas se centrifugaron a 10000xg/30 minutos a 4ºC y el sobrenadante recogido se centrifugó nuevamente durante 30 minutos a 4ºC.

Antígeno "O"

Los cultivos se suspendieron en PBS, se calentaron 1 h a 100ºC y posteriormente se mantuvieron en hielo 10 minutos. La concentración de la suspensión antigénica se ajustó a 10^9 cels/ml.

Los antígenos se conservaron a 4ºC hasta su uso.

4.1.3.3. Ensayo ELISA doble indirecto

Con el fin de determinar los niveles de anticuerpos específicos frente a la cepa en estudio en el suero de rodaballo, se ha utilizado un ELISA doble indirecto basado en el descrito por Estévez (1994) pero con ligeras modificaciones.

La dilución de los reactivos (suero hiperinmune, monoclonal anti-Ig de rodaballo y suero anti-Ig de ratón obtenido en conejo conjugado con peroxidasa) se determinaron mediante titulación con los controles positivos (antígenos cepa TO96.7.1 de A. salmonicida) y negativos (solución salina estéril y suero no inmune) adecuados. También se evaluaron los volúmenes y tiempos de incubación con el fin de elegir

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

las condiciones de trabajo que produjesen la máxima reactividad del positivo y mínima reactividad de la muestra negativa.

Las placas de ELISA de 96 pocillos de poliestireno (Corning) se tapizaron con 100 ml de antígeno/pocillo y se incubaron toda la noche a 4ºC en cámara húmeda. A continuación, las placas se bloquearon por adición de 100 ml/pocillo de TBS-T [Tris 0,5 M (Merck) + NaCl 1,5 M (Merck), pH 7,3+Tween 20 al 0,2 %] con un 3 % de leche descremada (Sigma) durante 1 hora a 25ºC y se lavaron 6 veces con agua destilada (ELISA Plate Washer, Corning, New York, EE. UU.). Seguidamente se añadieron 100 ml/pocillo del anticuerpo primario diluido (1/10-1/100) en TBS-T con leche descremada al 3 % y se incubó durante 1 hora y media a 25ºC. Pasado ese tiempo se procedió al lavado de la placa, se añadió el anticuerpo secundario (100 µl de monoclonal UR3, diluido 1/1000-1/2000 en TBS-T con leche descremada al 3 %) y se incubó 1 hora a 25ºC. Tras el lavado, se añadió el anticuerpo terciario comercial diluido (1/10000-1/40000) en TBS-T (100 µl de suero policlonal anti- Ig de ratón obtenido en conejo y conjugado con peroxidasa (Sigma) y se dejó incubar durante 1h a 25ºC. Previo lavado se procedió al revelado mediante la adición del sustrato O-fenilendiamina Dihidrocloruro (OPD, Sigma) a una concentración del 0.04 % en Tampón fosfato- citrato 0,05 M pH 5,0 que contiene Perborato de sodio al 0,03 % (Sigma Co.) y se incubó durante 15 min en la oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se detuvo a los 20 minutos por adición de ácido sulfúrico 1N, y las placas se leyeron a una Absorbancia de 492 nm (A_{492}) en un lector de placas (Bio-Rad Modelo 550). Los resultados se consideraron positivos si la absorbancia excedía al menos dos desviaciones estándar por encima de la media de los controles negativos.

Con el fin de optimizar este ensayo para una rápida detección de los anticuerpos circulantes en peces vacunados, se evaluaron diferentes temperaturas y tiempos de incubación para cada una de las fases. En

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

estos ensayos se utilizaron los títulos de antisuero y las suspensiones de antígenos que mostraron mejores resultados en el ensayo previo.

Para determinar la posible existencia de reactividad cruzada se determinaron los valores de absorbancia de los sueros hiperinmunes de rodaballo descritos en el apartado 4.1.3.1, frente a los antígenos de la cepa de *A. salmonicida* ssp. *salmonicida* TO96.7.1 y de las cepas de referencia de A. *salmonicida* ssp. *achromogenes* CECT 4238 y las cepas de *V. anguillarum* R-82 (serotipo O1), RG-111(serotipo O2α), y RV–22 (serotipo O2β).

El porcentaje de reactividad cruzada (RC) se determinó según la fórmula que se describe a continuación:

$$\%\ RC = (1 - \frac{(A492\ antígeno\ homólogo - A492\ antígeno\ heterólogo)}{A492\ antígeno\ homólogo}) \text{ x } 100$$

4.1.3.4. Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como la media ±desviación estándar.

4.1.4 Identificación de antígenos inmunogénicos

En este estudio se ha evaluado el potencial inmunogénico para rodaballo de preparaciones de antígenos (LPS y proteínas) de cepas de

A. salmonicida ssp. *salmonicida* con diferente origen. Además, se realizó un análisis comparativo de los antígenos expresados por *A. salmonicida* ssp. *salmonicida in vitro*, mediante el cultivo en un medio

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

inerte (TSA-1) y la inoculación en líneas celulares de peces (CHSE-214 y SAF-1) e "in vivo" tras la infección experimental de peces. Para este estudio los antígenos se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida e inmunoblot, según el procedimiento previamente descrito. Con este fin se utilizaron suero anti-TO96.7.1 obtenido en rodaballo (anticuerpo primario), suero anti-Ig de rodaballo (monoclonal UR3) y suero anti-Ig de ratón conjugado con peroxidasa. El revelado se realizó mediante la adición del sustrato del enzima como se describió previamente (apartado 4.1.3.3).

4.1.4.1. Obtención de antígenos in vitro e in vivo

Cultivos en medio bacteriológico

Las suspensiones de antígenos de la envoltura celular (LPS y proteínas) se obtuvieron según la metodología descrita en el apartado 3.1.3 a partir de cultivos bacterianos crecidos en TSA-1 a 20ºC/48h.

Cultivos en líneas celulares de peces

Para estos ensayos se utilizaron las líneas celulares SAF-1 (ECACC 00122301, línea comercial procedente de aleta de dorada) suministrada por la Colección Europea de cultivos celulares autentificados (ECACC) y CHSE (derivada de embrión de salmón Chinook, *Oncorhynchus tshawytscha*). Las células se mantuvieron rutinariamente en frascos de cultivo celular (25 cm^2), utilizando el medio esencial mínimo tamponado con solución de Earle (E-MEM) (Lonza, Biowhittaker, Verviers, Belgium) suplementado con 10% suero fetal de ternera sin antimicrobianos y a las temperaturas óptimas de cada

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

tipo celular (CHSE 18ºC y SAF-1, 25ºC). La suspensión de la cepa TO96.7.1 (10^9 cel/ml) se inoculó en dos frascos de cada tipo celular (100 µl frasco) y se incubó a la temperatura óptima de cada tipo celular durante 48h. Como control se utilizaron dos frascos de cada línea celular inoculados con E-MEM estéril. Finalizado el período de incubación, se recogió la totalidad del contenido del frasco, se centrifugó a 3000xg durante 5 minutos para eliminar las células eucariotas enteras y los restos celulares y el sobrenadante, que contenía la bacteria inoculada se centrifugo a 10000xg durante 30 min. El sedimento resultante se suspendió en 3 mL de tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 suplementado con 0,3% de NaCl (Panreac). La suspensión de antígenos bacterianos se obtuvo siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.1.3.

Infección experimental de peces

La obtención de los antígenos bacterianos a partir tejidos de rodaballos infectados se realizó siguiendo la metodología descrita por Schmidtke y Carson (2003) con ligeras modificaciones. En este ensayo se utilizó el riñón anterior de rodaballos de 30 g infectados experimentalmente con las cepas TO96.7.1 de *A. salmonicida*.

Las infecciones experimentales se realizaron siguiendo básicamente la metodología descrita en el apartado 3.1.4.1. Los peces (10 ejemplares), se inyectaron intraperitonealmente con 0,1 mL de las suspensiones bacterianas que contenían 10^9 céls/mL. En todos los ensayos se incluyeron, como control, un número igual de peces inoculados con 0,1 mL de PBS estéril.

Transcurridas 48 h desde la inoculación de las bacterias, los peces infectados y los peces control se sacrificaron por sobredosis de anestésico y se extrajo el riñón anterior que se depositó en un tubo que

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

contenía medio de cultivo celular E-MEM. El tejido del riñón se disgregó utilizando una malla de nylon de 100mm de luz y la suspensión celular obtenida se fraccionó por centrifugación (30000xg) utilizando el medio de separación celular Ficoll® 400 (Sigma-Aldrich), preparado en solución salina a una densidad de 1,1 g/ml, según las recomendaciones de la casa comercial. En paralelo y como control se procesó una suspensión de la cepa TO967.1 y de las suspensiones de células CHSE y SAF-1 inoculadas con medio estéril. La fracción que contenía las bacterias, identificada por comparación con los controles, se recuperó con ayuda de una pipeta Pasteur, se lavó por centrifugación y se suspendió en 3 mL de tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 suplementado con 0,3% de NaCl (Panreac). La suspensión de antígenos bacterianos se obtuvo siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.1.3.

4.1.4.2. Técnicas inmunológicas para detección de los antígenos

Doble difusión en gel

El ensayo de doble difusión en gel (DDG) se realizó en geles de agarosa (0,85% p/v en PBS) de 2-3 mm de espesor según la metodología de Ouchterlony (1949). Las muestras de antígenos (10µl) (proteínas y LPS de la envoltura celular, ajustadas a la misma concentración) se depositaron en pocillos de 3,5 mm alrededor de un pocillo central que contenía el suero anti-TO96.7.1 (10µl) obtenido en rodaballo. Los geles se colocaron en una cámara húmeda y se incubaron a temperatura ambiente durante 4h y a 4ºC durante toda la noche para permitir la difusión de las muestras de suero y antígenos. Las bandas de precipitación debidas a la formación de inmunocomplejos se visualizaron tras la tinción de los geles con una solución de azul Coomasie al 0,5% en 45% etanol y 10% (v/v) acético. Esta técnica permite determinar la existencia o no de determinantes comunes entre

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

antígenos según las características de las bandas formadas y estimar la cantidad de antígeno presente en base a la distancia de las bandas con respecto al anticuerpo.

Inmunoelectroforesis en cohete

Se realizó en geles de agarosa (10 ml) al 1% en 0,02M tampón Tris/barbital (pH 8,6) con el suero anti-TO96.7.1 incorporado a una dilución 1/50. Las muestras de antígenos (10µl) se depositaron en pocillos de 2,5 mm localizados en el cátodo y se sometieron a electroforesis a 2,5v/cm durante 20h. Finalizada la electroforesis se tiñeron los geles con una solución de azul Coomasie al 0,5% en 45% etanol y 10% (v/v) acético y se destiñeron con una mezcla de metanol:acético:agua (30:10:60). La formación de inmunocomplejos se detectó por la aparición de un precipitado triangular o en cohete. La concentración de Ag de la muestra se determinó midiendo la altura de los picos generados por cada muestra y comparándolos con una recta de calibrado construida analizando diferentes concentraciones de albúmina humana (1-10µg/ml) y anticuerpo anti-albúmina (Sigma) analizadas en las mismas condiciones.

Electroforesis e Inmunoblot

La electroforesis en geles SDS-PAGE y la transferencia electroforética se realizaron siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.4.1. Para la tinción inmunológica se utilizaron un anticuerpo primario (suero anti-TO96.7.1 obtenido en rodaballo), el monoclonal UR3 anti-Ig de rodaballo (anticuerpo secundario) y suero policlonal anti-Ig de ratón obtenido en conejo y conjugado con peroxidasa (Sigma)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(anticuerpo terciario). El revelado se realizó tras la adición del sustrato del enzima como se describió en el apartado 4.1.3.3.

4.2 RESULTADOS

4.2.1. Purificación del componente C3 de rodaballo

Las muestras de plasma obtenidas a partir de 20 rodaballos se mezclaron y se repartieron en fracciones de 1,0 ml que se conservaron a 4ºC, -30ºC y -80ºC hasta su uso.

Las proteínas del plasma de rodaballo, trucha y humana unidas al zimosan (ZC3) se analizaron mediante electroforesis en condiciones nativas y desnaturalizantes. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 22.

El componente C3 del complemento se purificó a partir del suero concentrado mediante precipitación con polietilenglicol. El C3 de rodaballo se eluyó con concentraciones de NaCl entre 0,2mM a 0,3mM. La concentración de proteínas se midió antes de pasar la muestra por la columna y posteriormente se midió en cada fracción.

La concentración de proteínas del suero concentrado utilizado fue de 3,0mg/ml, siendo la de cada fracción a representada en la Tabla 10. Las fracciones de intercambio iónico en las que se detectó contenido de proteínas se analizaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 8% en condiciones no desnaturalizantes (dato no mostrado) y desnaturalizante e inmunológicamente utilizando el suero anti-C3 de rodaballo obtenido en conejo (Figura 23).

El análisis electroforético en condiciones no desnaturalizantes mostró una banda con una masa molecular aparente de 180 kDa (datos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

no mostrados). En condiciones reductoras (figura 22) la masa molecular aparente de las cadenas a y ß fue de 110Kda y 80Kda, respectivamente.

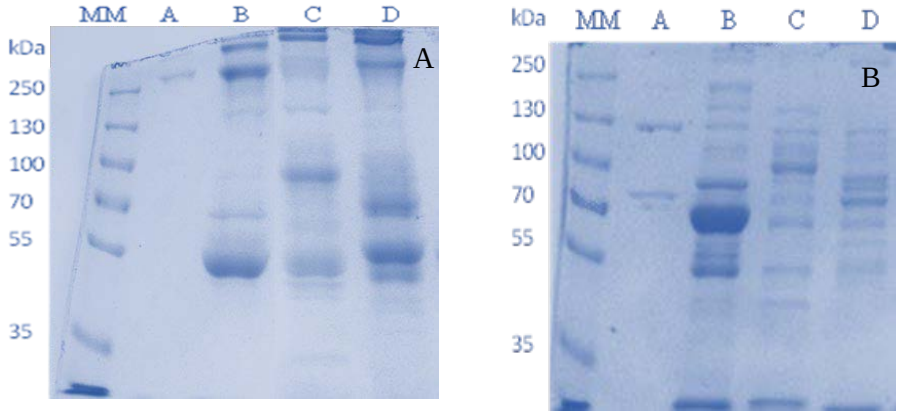


Figura 22 Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes (A) y esnaturalizantes (B) de las proteínas del plasma humano, de rodaballo y trucha que se unen a zimosan. Lineas: MM; marcador masa molecular, A, componente C3 humano (Sigma); B, ZC3- humano; C, ZC3-rodaballo y D, ZC3-trucha.

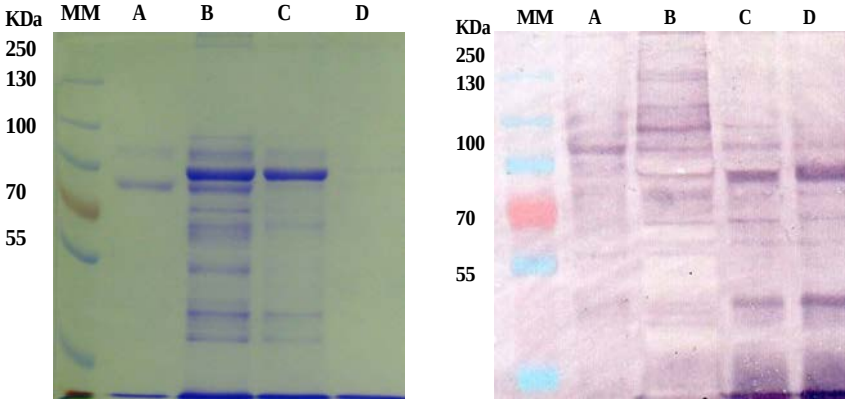


Figura 23. Análisis electroforético SDS-PAGE 8% (A) e Inmunoblot con el suero anti-C3 de rodaballo (B) de las fracciones del plasma de rodaballo separadas por cromatografía de intercambio aniónico (HiTrap Q HP). Líneas: MM, Marcador de masa molecular; A, B, C, D, Fracciones 3, 4, 5 e 6, respectivamente.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 10. Rendimiento de la cromatografía de intercambio iónico

Muestra	Concentración de proteína (mg/ml) fracciones CIA	
	0,2M NaCl	0,3M NaCl
F1	0	0,05
F2	0,29	0,60
F3	0,34	0,26
F4	0,33	0,05
F5	0,15	0
F6	0,12	0
F7	0,10	0
F8	0,03	0
F9	0,10	0
F10	0	0

El último paso de purificación se realizó mediante filtración en gel (columna Superdex™ 200 10/300 GL, GE Healthcare Bio Sciences AB), de la fracción F4 obtenida tras la cromatografía de intercambio iónico. El C3 se eluyó con Tris 20mM, 150mM NaCl, 0.1mM Pefablock, 5mM EDTA; pH 7.4, recogiéndose 30 fracciones con un volumen aproximado de 0,38ml cada una. En cada fracción se midió la concentración de proteínas (Figura 24) analizándose mediante SDS-PAGE e inmunoblot de las fracciones F 11 a F17 en las que se confirmó la presencia de las dos bandas (Figura 25). Además, se observó reactividad con otra proteína de masa molecular aparente de 45 KDa.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

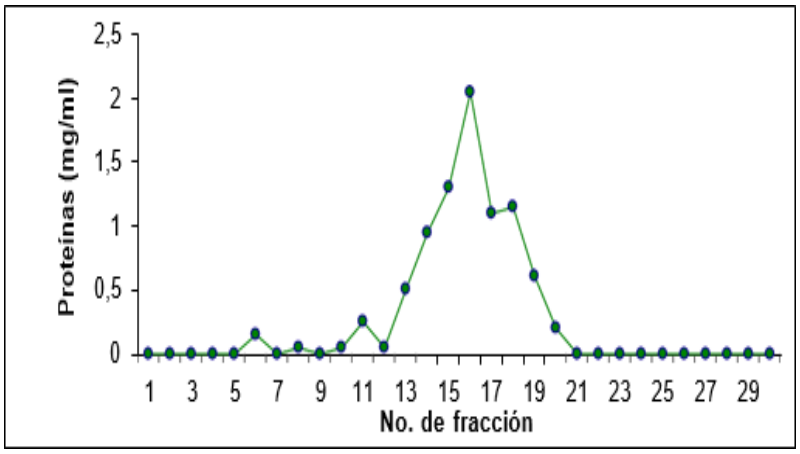


Figura 24.- Perfil de elución en cromatografía de filtración en gel (Superdex 200 10/300 GL) de la fracción F4 del suero de rodaballo obtenida mediante cromatografía de intercambio aniónico.

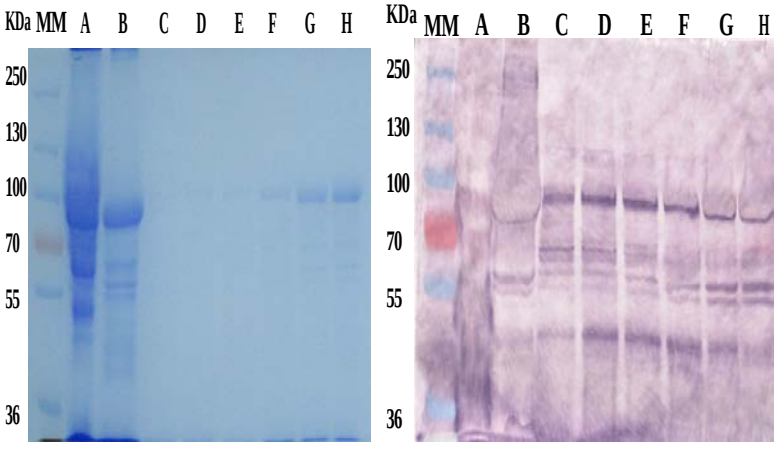


Figura 25. Electroforesis (SDS-PAGE) (A) e inmunoblot (B) con suero anti-C3 de rodaballo. Líneas: MM: Marcador de masa molecular; A, suero de rodaballo concentrado; B: Fracción 4 de intercambio aniónico; C a H, fracciones F11 a F17 obtenidas mediante filtración en gel.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2.2. Caracterización del componente C3 de rodaballo

Tratamiento proteolítico

El componente C3 de rodaballo fue muy sensible a la digestión con papaína a 37ºC, presentando una digestión total de la cadena α y una drástica reducción de la cadena β en una incubación inicial de 2 minutos, siendo esta última completamente digerida a los 60 minutos de incubación. No se observaron cambios en el perfil de bandas en el control incubado en las mismas condiciones, pero sin papaína (Figura Figura 26). Cuando se incubó la muestra con tripsina, la cadena α de C3 se degradó después de 24 horas de incubación. El control sin el enzima tripsina no mostró cambios a lo largo de la incubación (Figura 27).

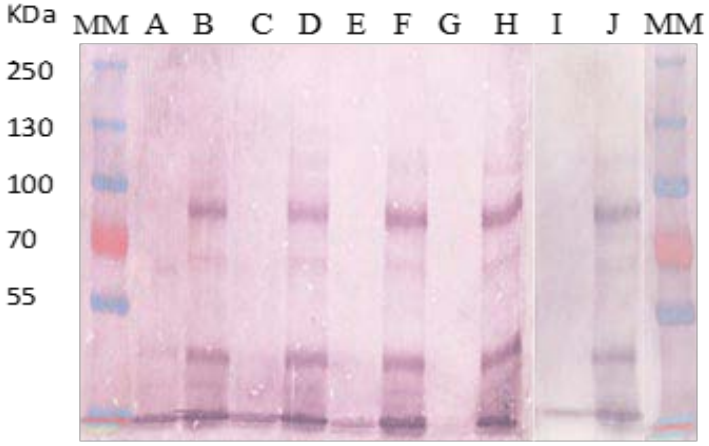


Figura 26. Efecto da papaína sobre el componente C3 del complemento de rodaballo evaluado por inmunoblot con suero anti-C3 de rodaballo. Líneas: MM, marcador de masa molecular; A, C, E, G, I, F4 tratada con papaína 2, 15, 30 e 60 min y 24h. B, D, F, H, J, F4 no tratada con papaína.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Detección de enlaces glicosídicos

La presencia de enlaces glicosídicos en el componente C3 del complemento de rodaballo se analizó mediante el kit comercial Glycoprotein Detection Kit (Sigma).

Los resultados indican (Figura 28) que tanto la cadena α como la β presentan enlaces glicosídicos.

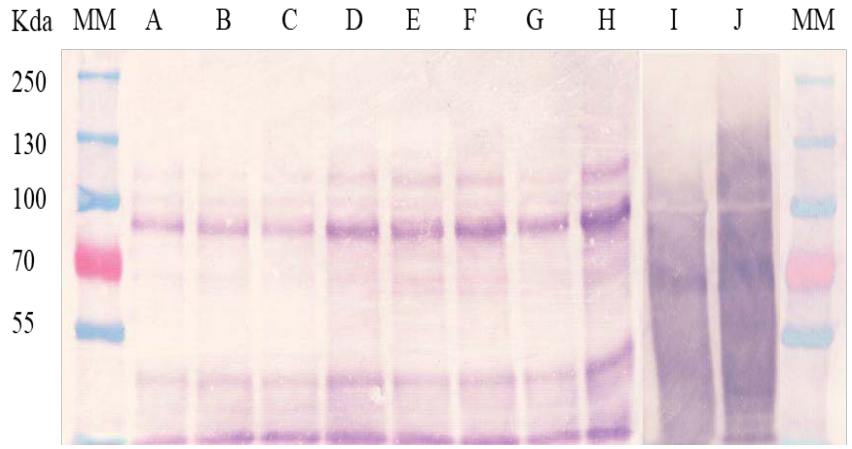


Figura 27. Efecto da tripsina sobre el componente C3 del complemento de rodaballo evaluado por inmunoblot con suero anti-C3 de rodaballo. Líneas: MM, Marcador de masa molecular; A, C, E, G e I, Fracción 4 obtenida mediante cromatografía de intercambio iónico e incubada 2, 15, 30 e 60 minutos y 24 horas respectivamente con el enzima tripsina; B, D, F, H e J, Fracción 4 no tratada con tripsina

4.2.3. Inmunoensayo enzimático para detección anticuerpos

Los resultados obtenidos utilizando el ensayo de ELISA doble indirecto desarrollado por Estévez (1994) y el suero hiperinmune obtenido en rodaballos inmunizados. frente a la cepa de *A. salmonicida*,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

TO96.7.1 demostraron que la respuesta de anticuerpos (relación señal: ruido) frente a la célula bacteriana inactivada con formol (CBF) es superior a la que se obtiene utilizando como antígenos los extractos crudos bacterianos (ECB) o el antígeno "O" (Tabla 11), aunque los niveles de fondo que se obtienen con el antígeno CBF son también ligeramente mayores a los observados con los antígenos ECB y "O".

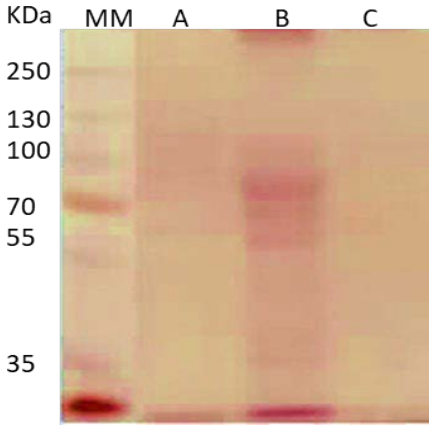


Figura 28. Detección de enlaces glicosídicos mediante el sistema de detección de glicoproteínas (Sigma). Líneas: MM, Marcador de masa molecular. A, suero de rodaballo incubado con Zimosan. B y C: Fracciones 3 y 4, del suero de rodaballo de rodaballo purificadas mediante cromatografía de intercambio iónico HiTrap Q HP.

Tabla 11. Resultados ELISA doble indirecto optimizado y suero anti.TO96.7.1 obtenido en rodaballo.

Tipo de antígeno	Absorbancia a 492 nm Media ± D.E.
CBF	1,200 ± 0,060
ECB	0,159 ± 0,045
"O"	0,121 ± 0,036

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Con el fin realizar una rápida detección de los anticuerpos circulantes en el suero de peces enfermos o inmunizados, se adaptaron las condiciones de incubación para cada una de las fases del inmunoensayo enzimático. Los resultados obtenidos indican que el ELISA optimizado puede realizarse en cuatro horas utilizando las condiciones (temperatura y tiempo de incubación) que se reflejan en la Tabla 12.

Tabla 12 Mejora de las condiciones de incubación del inmunoensayo enzimático para detección de anticuerpos.

Fases ensayo	ELISA (Estévez, 1994)	ELISA presente estudio
Tapizado	12 horas (4°C)	1h (37ºC)
Bloqueo	1h (25°C)	30 min (37ºC)
Anticuerpo 1º	1h y 30 min (25°C)	1h (37ºC)
Anticuerpo 2º	1h (25°C)	30 min (37ºC)
Anticuerpo 3º	1h (25°C)	30 min (37ºC)
Revelado	30min (25°C)	20 min (37ºC)
Lavados	30 min (25ºC)	10 min (37ºC)
Tiempo Total	17h 30 min	4h

Para detectar la existencia de antígenos con reactividad cruzada se procedió al análisis del suero hiperinmune anti-TO96.7.1 obtenido en rodaballo frente a antígenos homólogos y heterólogos. La evaluación de la reactividad cruzada se realizó utilizando la técnica de ELISA optimizada.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Los resultados de este estudio (Tabla 13) revelaron la existencia de baja reactividad cruzada (% de RC ≤11) cuando se valoraban el suero anti-TO96.7.1 frente al antígeno de las cepas R.82 (serotipo O1), RV-22 (subgrupo O2b del serotipo O2) y RG-111 (subgrupo O2α del serotipo O2 de *V. anguillarum*).

4.2.4. Antígenos de *A. salmonicida* inmunogénicos para rodaballo

El potencial inmunogénico para rodaballo de los componentes de la envoltura celular (proteínas y LPS) obtenidos frente a diferentes cepas de *A. salmonicida* spp *salmonicida* se evaluó utilizando el suero obtenido en rodaballo frente a las células completas de la cepa TO96.7.1 y las técnicas DDG e inmunoelectroforesis en cohete.

Tabla 13. Reactividad cruzada del antisuero TO96.7.1 con antígenos de tres serotipos de Vibrio anguillarum.

	anti-TO96.7.1
Antígenos	Media ± DE
R-82	8,5 % ± 4.0
RV-22	8,4 % ± 2,2
RG-111	10,9 % ± 3,2
TO96.7.1	100 % ± 0,0

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Los resultados de los ensayos DDG e inmunoelectroforesis en cohete se muestran en la Figura 29. Los resultados obtenidos indican que la inmunización de rodaballos con células inactivadas con formaldehido de la cepa TO96.7.1 induce la producción de anticuerpos con reactividad frente a las proteínas y LPS de la envoltura celular, con una mayor reactividad cuando se utilizan las proteínas como antígenos. Además, en el ensayo DDG se observa una banda de precipitación con forma de arco continuo. Estos resultados indican que el suero anti-TO96.7.1 reconoce los mismos epítopos en los antígenos de la envoltura celular de cepas de *A. salmonicida* spp. *salmonicida* aisladas de diferentes especies de peces.

Para determinar qué componentes de la superficie celular se expresan durante la infección, se analizaron los antígenos de las bacterias recuperadas a partir de las líneas celulares de peces CHSE-214 y SAF-1 y del riñón de peces infectados con la cepa TO96 7.1 y se compararon con los obtenidos a partir de la bacteria cultivada en el medio inerte TSA-1.

El resultado del análisis mediante electroforesis e inmunoblot se muestra en Figura 30. No se observaron grandes diferencias en los perfiles proteicos de las muestras obtenidas a partir de la cepa cultivada *in vitro* (células CHSE-214 y SAF-1 y medio TSA-1) e *in vivo* (riñón de peces infectados experimentalmente). Sólo las proteínas mayoritarias presentes en la cepa de *A. salmonicida* reaccionaban intensamente con el antisuero obtenido en rodaballo. Sólo se observó una fuerte reacción positiva con el componente intermedio de los LPS (dato no mostrado).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

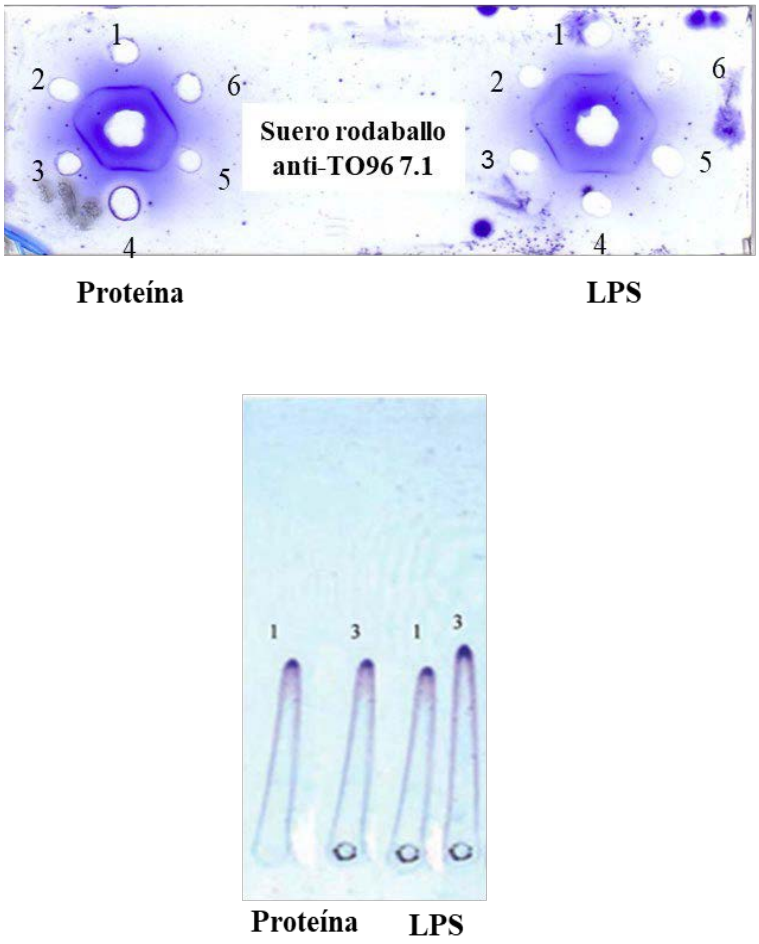


Figura 29. Ensayo de Doble Difusión en Gel (A) y electroforesis en cohete (B) utilizando suero anti-TO96.7.1 obtenido en rodaballo y como antígenos proteínas y LPS de la envoltura celular. 1, y 2 cepas TO 96 7.1 y IAs06.1, aisladas de rodaballo; 3,4 y 5, cepas ATCC33658, SK401/06 Y 379/05, aisladas de salmónidos; 6, cepa L3R, aislada de lamprea.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

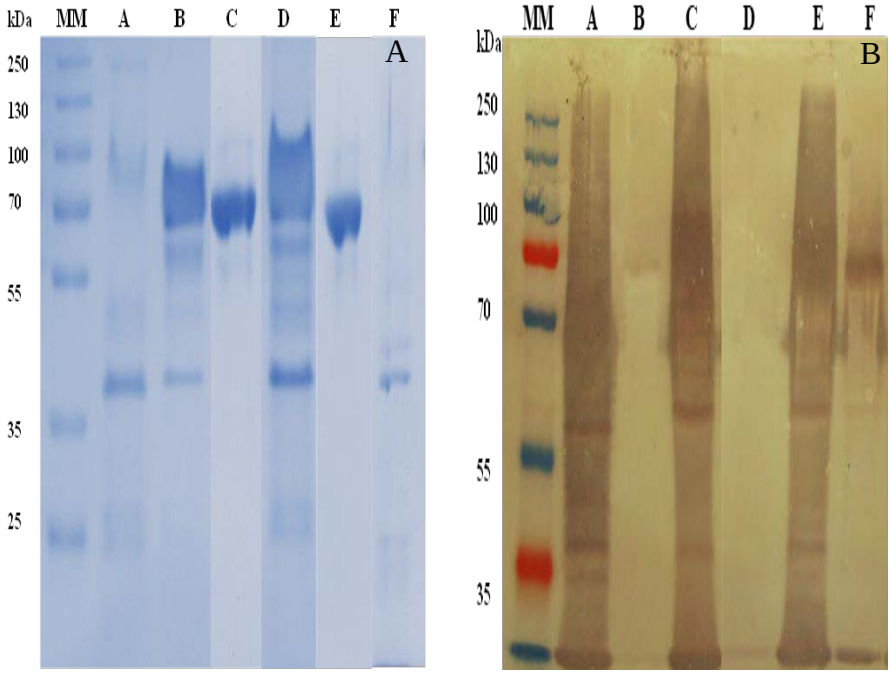


Figura 30. Análisis electroforético (A) e inmunológico (B) de las proteínas de la envoltura celular expresadas in vitro e in vivo por A. salmonicida. Líneas: MM, marcador de masa molecular; A, B, D, proteínas obtenidas de la bacteria cultivada en medio TSA-1 y en las líneas celulares CHSE-214 Y SAF-1, respectivamente; C y E, control CHSE y SAF-1; F, proteínas bacteria recuperada de los tejidos infectados.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.3. DISCUSIÓN

El cultivo del rodaballo es actualmente una de las alternativas más importantes para suplir la falta de pescado procedente de las pesquerías. Desde el punto de vista económico, uno de los factores que más ha contribuido al éxito de la acuicultura ha sido el establecimiento de adecuadas políticas de vacunación. De hecho, en determinadas patologías, la obtención de vacunas ha marcado la diferencia entre hacer viable económicamente el proyecto de cultivo o cerrar la instalación. Una de las principales enfermedades bacterianas que limitan la producción de rodaballo en el área gallega es la furunculosis causada por *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida*.

El establecimiento de medidas de prevención basadas en la vigilancia del estado sanitario de los peces y en el uso de vacunas y de estrategias de inmunización eficaces es, sin duda, la mejor opción para mejorar la productividad en las plantas de cultivo.

El desarrollo de vacunas eficaces y el conocimiento del estado sanitario de los peces depende, en gran parte, del desarrollo de métodos estándar para el análisis del sistema inmunitario y su capacidad de respuesta frente a patógenos. Por ello, el primer objetivo abordado en este capítulo fue desarrollar herramientas que permitan valorar la respuesta inmunitaria humoral (específica y no específica) del rodaballo. Con este fin, el estudio se centró en la caracterización del componente C3 del complemento y la obtención de un antisuero para su detección y la optimización de un inmunoensayo enzimático para la detección de anticuerpos específicos frente a *A. salmonicida* spp. *salmonicida* en el suero de rodaballo.

El sistema inmunitario de los peces, al igual que el de vertebrados, se compone de un sistema adaptativo y un sistema innato (Boshra y col, 2006; Dalmo y col., 1997; Ellis, 1999; Godoy, 2010; Gómez y col,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2013; Secombes y Wang, 2012; Scapigliati y col., 1999; Sunyer y col,1998; Dixon y Stet, 2001; Watts y col., 2001; Tort y col., 2003; Magnadóttir, 2006). El sistema del complemento es un nexo importante entre ambos sistemas, e incluye más de 35 proteínas solubles y de membrana (Boshra y col, 2006; Sunyer y col, 2003). El sistema del complemento puede activarse a través de tres vías, vía clásica, vía alternativa y la vía de la lectina (Boshra y col, 2006; Sunyer y col, 2003). El sistema del complemento juega un papel fundamental en la detección y eliminación de patógenos y contribuye significativamente al desarrollo de la respuesta inmunitaria específica (Boshra y col, 2006; Sunyer y col, 2003).

El componente mejor caracterizado del sistema del complemento es C3, que juega un papel esencial en todas las vías de activación (Boshra y col, 2006; Sunyer y col, 1998; Sunyer y col, 2003). En peces teleósteos (Sunyer y col, 1996; Sunyer y col, 1998) se han descrito varias isoformas activas de C3, que muestran variación en la capacidad de unirse a las superficies y son el producto de diferentes genes. Esta combinación de diversidad y alta actividad a bajas temperaturas hace que el complemento sea considerado uno de los parámetros inmunológicos más efectivos en peces (Sunyer y Lambris, 1998).

Además de un importante factor humoral en la defensa de los peces adultos, el C3 es uno de los factores de la inmunidad innata materna (Wang y col, 2008; Lovoll y col, 2006) que se transfiere a la descendencia confiriendo protección frente a los patógenos durante los primeros estadios de vida de los peces. Así mismo, se ha demostrado que los componentes del complemento son sintetizados por el embrión en estadios tempranos del desarrollo contribuyendo a luchar contra los patógenos invasores en dicha fase (Lovoll y col, 2006).

El C3 se ha caracterizado en un gran número de especies animales, incluyendo los peces (Sunyer y col, 1996 y 1997; Lange y col, 2004;

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Nakao y col, 2000). El papel del componente C3 ha sido también estudiado en larvas de diferentes especies de peces como, el fletán (*Hippoglossus hippoglossus* (L.) (Hermannsdottir y col., 2009, Lange y col, 2004b) y bacalao del Atlántico (*Gadus morhua* L.) (Lange et al. 2004c) y en los huevos y embriones del pez cebra, *Danio rerio* (Wang y col., 2009a). Estos estudios se han visto facilitados por la existencia de herramientas serológicas y moleculares. Sin embargo, y a pesar de la relevancia de este factor humoral del sistema inmune, hasta el momento no se ha descrito la caracterización del componente C3 del rodaballo. Por ello, en este estudio se ha abordado en primer lugar la purificación y caracterización del tercer componente del complemento (C3) del rodaballo y la producción de anticuerpos específicos contra estas proteínas, con el fin de desarrollar herramientas serológicas para el estudio del papel del C3 en la respuesta inmunitaria del rodaballo.

Este trabajo ha demostrado que el componente C3 del rodaballo está constituido por proteínas de dos cadenas (α y ß) con una masa molecular de 110 y 80 kDa. Ambas cadenas tienen un tamaño similar al descrito para las cadenas C3 de mamíferos y peces. Con el procedimiento de purificación utilizado no se han detectado la existencia de isotipos de C3, a diferencia de lo descrito para trucha, carpa y dorada (Sunyer y col, 1996, Sanyer y col, 1997; Nakao y col, 2000). Además, el uso del sistema de detección de glicoproteínas demostró la presencia de azúcares en las cadenas α y ß. Las diferencias en la masa molecular de las cadenas α y ß con respecto a las descritas en el complemento humano y de otras especies pueden deberse a diferencias en el contenido de azúcar. Estudios previos han demostrado que el grado de glicosilación del componente C3 del complemento varía entre especies y que las diferentes isoformas del componente C3 del complemento observadas en algunos peces teleósteos difieren en el número de sitios potenciales de glicosilación (Lange et al., 2004a).

La digestión proteolítica del componente C3 del rodaballo se

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

evaluó utilizando las enzimas proteolíticas papaína y tripsina. El componente C3 del rodaballo fue muy sensible a la digestión con papaína, presentando una digestión completa de las cadenas α y β. En contraste, cuando se incubó con tripsina, sólo la cadena α de C3 se degradó después de 24 horas de incubación. Se describieron resultados similares cuando se analizó el efecto de las mencionadas proteasas sobre los componentes C3 del bacalao y fletán (Lange et al., 2004a).

El suero policlonal anti-C3 del rodaballo detectó las cadenas α y β y una banda adicional con una masa molecular de 45 kDa tanto en el C3 purificado (fracciones de intercambio iónico y filtración en gel) como en el suero completo. Sería necesario realizar más estudios para identificar dicha proteína y determinar su posible función.

En conclusión, en el presente estudio se ha llevado a cabo la caracterización parcial del componente C3 del complemento de rodaballo y se ha obtenido un anticuerpo policlonal capaz de detectarlo que puede ser utilizado como herramienta para un mejor conocimiento del funcionamiento del sistema del complemento y de la respuesta inmunitaria asociada en rodaballo.

Un segundo objetivo abordado en este capítulo fue la optimización de un inmunoensayo enzimático (ELISA) doble indirecto para la detección de anticuerpos específicos frente a *A. salmonicida* spp. *salmonicida* en el suero de rodaballo, basado en el desarrollado por Estévez (1994).

Los resultados obtenidos utilizando el ensayo de ELISA doble indirecto optimizado y suero obtenido en rodaballos frente a las cepa de *A. salmonicida* TO967 demostraron que, en las condiciones de ensayo establecidas, el uso de antígeno frente a la célula bacteriana inactivada con formol (CBF) confiere una respuesta de anticuerpos (relación señal: ruido) superior a la que se obtiene utilizando como antígenos los extractos crudos bacterianos (ECB) o el antígeno “O”, si

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

bien los niveles de fondo son también ligeramente más elevados que los observados con los antígenos ECB y "O". Resultados similares han sido ya descritos por otros investigadores (Bogwald y col., 1991; Lund y col., 1991) empleando células bacterianas completas. Además, se adaptaron las condiciones de incubación y las diluciones de los anticuerpos para cada una de las fases del ELISA, de modo que el ensayo optimizado puede realizarse en aproximadamente 4 horas, reduciendo considerablemente el período para la obtención de resultados con respecto al ensayo original (17,5 h) descrito por Estévez (1994).

El desarrollo de vacunas requiere la identificación de los antígenos del patógeno que son reconocidos por el hospedador y que inducen una respuesta inmune protectora, con el fin de optimizar las condiciones de cultivo que favorezcan la máxima expresión de los compuestos inmunogénicos y, por tanto, mejoren la eficacia de la vacuna. Por ello, en la tercera parte de este estudio se abordó el estudio y caracterización de los antígenos presentes en la envoltura celular de cepas de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* aisladas a partir de diferentes especies de pez en distintas áreas geográficas.

El análisis inmunológico de los componentes de la envoltura celular (proteínas y LPS) de las cepas de *A. salmonicida* mediante DDG e inmunoelectroforesis en cohete utilizando el suero anti-TO96.7.1 obtenido en rodaballo sugiere que las proteínas son el principal componente inmunogénico para esta especie de pez. La información disponible sobre el papel jugado por los LPS como inmunógenos para peces es variable y contradictoria. Mientras algunos estudios han demostrado que los lipopolisacáridos de la envoltura celular bacteriana son el principal componente inmunogénico para peces (Churt y Trust, 1984; Evelyn, 1984; Salati y col., 1984, Velji y col, 1992), otros resultados avalan que las proteínas y/o los complejos proteína-LPS de la envoltura celular son los responsables de la respuesta inmune

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

protectora observada en peces vacunados (Bogwald y col., 1990; Santos, 1991).

Un último aspecto abordado en el presente trabajo fue el análisis comparativo de los antígenos expresados por *A. salmonicida* durante el crecimiento de los microorganismos en condiciones "in vitro" (cultivo en medio TSA-1 y en las líneas celulares de peces CHSE-214 y SAF-1) e "in vivo" (durante la infección en rodaballo). Los resultados obtenidos parecen indicar que, *A. salmonicida* expresa antígenos similares cuando crece "in vivo" e "in vitro". Será necesario realizar más estudio con un número mayor de cepas para confirmar estos resultados. Una importante limitación del presente estudio es que el antisuero utilizado fue obtenido frente a células completas cultivadas en condiciones de laboratorio que no reproducen las condiciones de crecimiento en el pez e inactivadas con formaldehido y, por tanto, algunos epítopos pueden haber sido expresados en bajas proporciones o alterados por el tratamiento con el aldehído. Resultados similares han sido ya descritos por otros investigadores (Bogwald et al., 1991; Lund et al., 1991) empleando células bacterianas completas.

En conclusión, los resultados del presente estudio han permitido el desarrollo de herramientas que pueden ser de utilidad para el estudio de la respuesta inmunitaria del rodaballo frente a la infección y la vacunación, así como para la selección de antígenos de interés para la producción de vacunas frente a la furunculosis típica causada por *A. salmonicida* ssp. *salmonicida.*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 5

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

5 EFECTO DE LA INFECCIÓN SOBRE PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS E INMUNOLÓGICOS DEL RODABALLO

5.1.MATERIALES Y MÉTODOS

El objetivo de este estudio no fue determinar la tasa de mortalidad, si no evaluar los efectos de la infección experimental con *A. salmonicida* sobre parámetros hematológicos e inmunológicos del rodaballo, con el fin de valorar su utilidad en el análisis del estado de salud de los peces. En concreto, se evaluó el efecto de la infección por

A. salmonicida sobre el hematocrito, niveles de hemoglobina y algunos parámetros del sistema inmune innato humoral (actividad lisozima y actividad bactericida) y celular (actividad respiratoria de leucocitos) del rodaballo.

5.1.1. Cepas bacterianas y peces utilizados

En el presente estudio se ha utilizado la cepa TO96.7.1 de *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*. Las condiciones de cultivo fueron las descritas en el apartado 3.1.1 de esta memoria.

Para las infecciones experimentales se utilizaron rodaballos sanos provenientes de acuicultura con un peso medio de 68±0,5g. Los peces se mantuvieron en tanques de cemento con un caudal de flujo abierto de 15 l/Kg/hora, salinidad de 32‰, a temperatura de 16ºC y con una cantidad de oxígeno disuelta no menor a 8 mg/L, reproduciendo de la forma más cercana posible los parámetros de cultivo de procedencia de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

los peces. Durante el período de experimentación, los peces fueron alimentados “ad libitum” con pienso comercial del mismo tipo y marca que el consumido en la piscifactoría de origen.

5.1.2. Infección experimental y protocolo de muestreo

Las infecciones experimentales con la cepa de *Aeromonas salmonicida* TO96.7.1 se realizaron siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.1.4 de esta memoria.

Antes de proceder a realizar la infección experimental, los peces se anestesiaron con MS222 (Sigma) (100 mg/ml) y se inyectaron intracelómicamente con 0,1 ml de las suspensiones bacterianas que contenían 10^9 (Dosis alta, DA) y 10^8 (Dosis baja, DB) células/ml de *A. salmonicida*, utilizando 100 peces por dosis. En todos los ensayos se incluyeron, como control, un número igual de peces inoculados con solución salina estéril.

Una vez realizada la infección de los peces, se procedió a la recolección de muestras según el protocolo de muestreo descrito en la . Antes de la infección experimental, se tomaron muestras de sangre de los peces del lote que se iba a utilizar en los ensayos. Tras la infección experimental, se realizaron muestreos al azar de los grupos de peces control e infectados a las 3, 6, 24, 48, 72, 96 y 168 horas después de la infección. En cada muestreo, los peces se sacrificaron por sobredosis de anestésico (MS222, Sigma), se pesaron y midieron y se extrajo la sangre antes de proceder a la necropsia para intentar recuperar las bacterias inoculadas a partir de los órganos internos mediante siembra en placa en los medios AM y TSA-1 o su detección mediante PCR.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 14. Protocolo de muestreo y número de peces analizados.

Muestreos (horas)	Peces infectados		Peces control
	Dosis alta	Dosis baja	
0	--	--	10
3	10	10	10
6	10	10	10
24	10	10	10
48	10	10	10
72	10	10	10
96	10	10	10
168	10	10	10

5.1.3. Obtención de la sangre y suero

La sangre se obtuvo por punción de la vena caudal utilizando jeringuillas con heparina (hematocrito y hemoglobina) o sin heparina (suero para determinación de parámetros del sistema inmune innato). La sangre con heparina se analizó de forma inmediata. Para la obtención de suero, la sangre no heparinizada se procesó como se describió previamente (apartado 4.1.3.1) y el suero obtenido se distribuyó en fracciones de 1 ml que se mantuvieron congeladas a -30ºC hasta su uso.

5.1.4. Determinación del hematocrito y hemoglobina

Hematocrito

El hematocrito de peces infectados y control se determinó mediante centrifugación (3000xg durante 3 minutos) de la sangre heparinizada utilizando capilares de microhematocrito. El valor de hematocrito se

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

determinó con un lector de microhematocrito y se expresó como porcentaje de fracción sólida de sangre respecto a la fase líquida.

Hemoglobina

Los niveles de hemoglobina en la sangre de peces infectados y control se determinaron espectrofotométricamente por el método de la cianometahemoglobina utilizando el sistema comercial Hemoglobin colorimetric detection kit, (In vitrogen), diseñado para cuantificar todas las formas de hemoglobina presentes en la sangre y los glóbulos rojos, o en el plasma y el suero. Para realizar el ensayo se dispensaron 10 µl de sangre diluida 1:5 por pocillo en una placa de microtitulación y a continuación se añadieron 100µl del reactivo de detección de hemoglobina. La placa se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y se procedió a la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 560 nm para detectar la intensidad del color generado. La concentración de hemoglobina de la muestra se determinó por comparación con la curva estándar construida utilizando hemoglobina humana (0-16g/dL) proporcionada por la casa comercial. Los resultados se expresaron en g/dL.

5.1.5. Efecto de la infección sobre la respuesta inmune innata

5.1.5.1. Efecto sobre la actividad respiratoria de leucocitos

Obtención de leucocitos y determinación de la viabilidad

Los peces se sacrificaron por sobredosis de anestésico (MSS-222,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

200mg/ml) y se extrajo la sangre de forma aséptica por punción de la vena caudal como se describió en el apartado 5.1.3. Para acceder a los órganos internos se practicó un corte en bolsillo y se extrajo el riñón cefálico, que se depositó en un tubo con medio esencial mínimo de Eagle (E-MEM, Biochrom, Cambridge, UK), suplementado con 10 IU/ml de heparina y antibióticos (100 IU/ml de penicilina, y 100 µg /ml de estreptomicina, Biochrom). A continuación, se disgregó el tejido del riñón forzando su paso a través de una malla de nylon (100 µm) con la ayuda de una espátula de acero estéril y la adición de medio E-MEM suplementado con antibiótico. La suspensión celular resultante se depositó en un tubo con medio de separación celular Ficoll-Paque TM PLUS (polisacárido sintético, Amersham Biosciences, Suecia) y se centrifugó (400xg a 4ºC) durante 20 min. La interfase rica en leucocitos se recogió con ayuda de una pipeta Pasteur estéril, se lavó por centrifugación con medio E-MEM y el precipitado celular resultante se suspendió en un ml de medio MEM suplementado con 5% de suero fetal (E-MEM-5).

La viabilidad de los leucocitos se determinó por el método de exclusión con azul tripano estéril 0,4% (Sigma). Con este fin, se mezclaron 50 µl de la suspensión celular diluida 1:10 con 10µl de la solución de azul tripano y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente antes de proceder al recuento de los leucocitos viables al microscopio óptico (Nikon Eclipse 50i) utilizando una cámara Neubauer (Brand).

Estudio del estallido respiratorio

El estallido respiratorio se cuantificó mediante citometría de flujo, empleando como sonda una disolución 10mM de dihidrorodamina 123 (123-DHR, Sigma) en Dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma), según la metodología descrita por Smith y Weidemann (1993). La

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

dihidrorodamina 123 es una molécula no fluorescente, que al reaccionar con los compuestos reactivos del oxígeno y/o del nitrógeno producido durante el estallido respiratorio, se oxida intracelularmente dando lugar a un compuesto fluorescente (DHR-123 fluorescente).

Para el estudio del estallido respiratorio de los leucocitos de rodaballos infectados y control, se mezclaron 1 ml de la suspensión en E-MEM-5 de leucocitos de riñón (10^6 cel/ml) con 50 µl de Acetato de Forbol Miristato (PMA, 0,2µg/ml, concentración final), un activador soluble del estallido respiratorio y se incubaron a 18ºC durante 45 min. Como control negativo se utilizaron leucocitos a los que se les añadieron 50µl de MEM-5 (células no estimuladas) mantenidos en las mismas condiciones que los leucocitos estimulados. Finalizada la incubación, se añadieron a todos los tubos 50µl de 123-DHR (5µM de concentración final), se incubaron las células en oscuridad durante 30 minutos. Posteriormente, se añadió una solución de yoduro de propidio (IP, concentración final de 0,02% v/v) se incubóa durante 2 min . Las muestras se analizaron en un citómetro FACScalibur (Becton Dickinson). En cada muestra se analizaron 10000 células viables (con marcaje negativo a ioduro de propidio) en la ventana de adquisición asignada a los granulocitos en el bitmap de FCS frente a SSC y analizados mediante el software CELLQUEST (Beckton Dikinson). Se determinó la media geométrica de la intensidad de fluorescencia (GMFI) intracelular de las células no estimuladas y de las estimuladas con PMA en el citómetro de flujo (canal FL1H, filtro de banda de 530 nm). Los resultados se expresaron mediante el índice de estimulación (IE):

$$IE = \frac{GMFI\ de\ leucocitos\ estimulados\ con\ PMA}{GMFI\ de\ leucocitos\ no\ estimulados}$$

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.1.5.2. Efecto de la infección sobre la respuesta humoral innata

En este estudio se han evaluado dos parámetros del sistema inmunitario no específico: actividad lisozima y actividad bactericida del suero de rodaballo.

Actividad lisozima del suero de peces

La actividad lisozima del suero de peces se evaluó por el método turbidimétrico se utilizó una técnica descrita por Parry y col., (1965) y modificada por Grinde y col., (1988) que emplea células de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma) como sustrato para el enzima lisozima. Para la realización del ensayo se trató una suspensión de *Micrococcus lysodeikticus* (0,003g/ml en tampón fosfato potásico 0,1M, pH 6,4) con el suero de peces (diluido 1/3 en el mismo tampón) y se leyó la absorbancia en lector ELISA a 450 nm a tiempo cero y a intervalos de 1 minuto durante un total de 4 minutos. Como blanco se utilizó la suspensión bacteriana tratada con el tampón de ensayo. Los resultados se expresaron en unidades enzimáticas (UE) por mililitro de suero. Una unidad de actividad lisozima se definió como la cantidad de enzima que produce una reducción en la absorbancia de 0,001/min.

Actividad bactericida del suero de peces

La capacidad de supervivencia de *A. salmonicida* spp. *salmonicida* en contacto con el suero de peces se evaluó mediante un método colorimétrico usando un derivado del tetrazolio, el 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-bromuro de difeniltetrazolio (MTT), compuesto que es reducido por las deshidrogenasas bacterianas adquiriendo un color púrpura. Para este ensayo se utilizó un cultivo en caldo de soja tripticaseína suplementado con NaCl al 1% (TSB-1) de la cepa de *A. salmonicida* ssp. *salmonicida* cepa TO96.7.1, ajustado a una

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

concentración de 10^8 células/ml. El ensayo se realizó en placas de microtitulación de fondo plano (Costar), utilizando tres réplicas por muestra de suero. El ensayo se realizó mezclando 20 ml de suero y 80 ml de la suspensión de bacterias por réplica. Tras un periodo de incubación de 12h se añadió el reactivo (MTT, 5 mg/ml en agua destilada), se incubaron las placas en oscuridad durante 15 min y se leyó la absorbancia a 620 nm en el lector de microplacas (BioRad). El número de bacterias viables presentes en el inóculo bacteriano inicial se determinó por recuento en placa. Como blanco se utilizó una mezcla de medio de cultivo bacteriano y de suero control. Como control negativo se utilizó la suspensión de bacterias tratada con el medio TSB- 1 estéril. Los resultados se expresaron mediante el índice bactericida (IB) definido como:

$$IB = \frac{A620\ de\ la\ muestra\ tratada\ con\ suero}{A620\ del\ control\ negativo}$$

5.1.6. Análisis estadístico

Todos los experimentos se hicieron por triplicado para cada pez, utilizando al menos seis a 10 peces por ensayo. Los resultados se expresaron como la media ± el error estándar (ES) de los datos analizados. Los datos se compararon usando la prueba ANOVA de una vía ($p<0,05$) y se comprobaron las diferencias significativas ($P<005$) mediante la prueba de Bonferroni

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.2.RESULTADOS

5.2.1. Infección experimental con *A. salmonicida*

El resultado del análisis microbiológico de los peces infectados experimentalmente se muestra en la Tabla 15. La cepa de *A. salmonicida* se recuperó en cultivo puro a partir de órganos internos de todos los peces analizados a lo largo del período de muestreo excepto en el muestreo realizado a las 48h post infección con la DA (Tabla 15). En los peces infectados con la dosis baja (DB) la bacteria sólo se recuperó en cultivo en los muestreos realizados durante las primeras 6 h post infección (Tabla 15). La posición taxonómica de la bacteria aislada se confirmó mediante PCR en tiempo real usando los cebadores AsalaopO-FW y Asal-aopORV y las condiciones de amplificación antes descritas (3.1.2.3).

5.2.2. Efecto de la infección sobre el hematocrito y nivel de hemoglobina

Los resultados del análisis de sangre indicaron que el hematocrito de los peces infectados y control oscilaba entre valores de 16% y 24% (Figura 31 A).) y los de hemoglobina entre 3,17 y 5,13 g/dL (Figura 31B). No se detectaron diferencias significativas en el valor hematocrito ni en los niveles de hemoglobina entre peces infectados y peces control a lo largo del período de estudio, con independencia de la dosis bacteriana utilizada para la infección.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 15 Recuperación de Aeromonas salmonicida a partir de peces infectados experimentalmente.

Peces	Tiempo postinfección	TSA-1	AM
Control	0h	-	-
	3h	-	-
	6h	-	-
	24h	-	-
	48h	-	-
	96h	-	-
Inoculados con dosis baja ($1x10^8$ cel/ml)	3h	+	-
	6h	+	-
	24h	-	-
	48h	-	-
	96h	-	-
Inoculados con dosis alta ($1x10^9$ cel/ml)	3h	+	+
	6h	+	-
	24h	+	-
	48h	-	-
	96h	+	+

+, aislamiento de la bacteria a partir de tejidos, -, la bacteria no se recupera

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

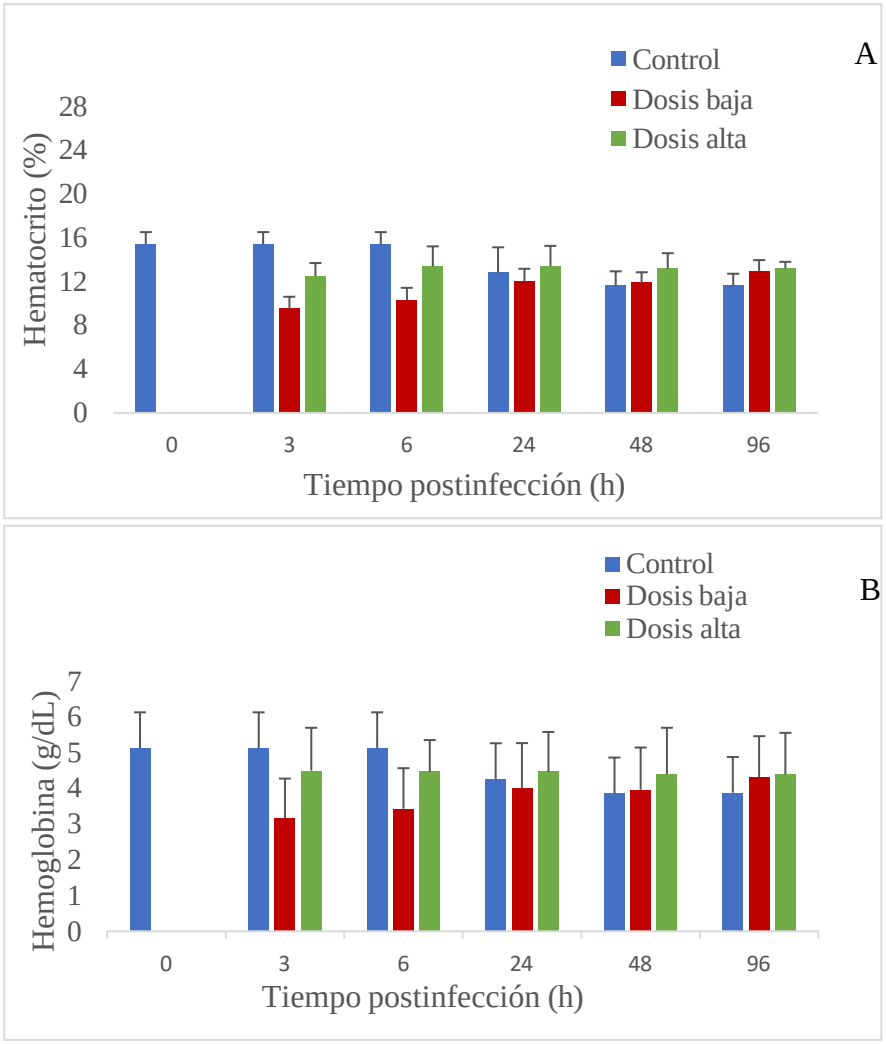


Figura 31. Valores del hematocrito (A) y niveles de hemoglobina (B) en rodaballos infectados experimentalmente con la cepa TO96.7.1 de A.salmonicidas spp. salmonicida.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.2.3. Estallido respiratorio de leucocitos de riñón

Los granulocitos del riñón anterior de los rodaballos infectados con la cepa TO96.7.1 de *A. salmonicida* (DB y DA), mostraron una actividad respiratoria, expresada como índice de estimulación (IE), similar o ligeramente inferior a la observada en peces control en las primeras 24h postinfección (Figura 32). Trasnscurridas 48h desde el inicio del experimento, se observó un incremento del IE en los fagocitos renales de rodaballo, que fue mayor en los granulocitos de peces infectados (DB y DA) con *A. salmonicida* que en los peces control (Figura 31). A las 96h postinfección el IE de los granulocitos de peces infectados (DA y DB) descendió a valores inferiores a los observados en peces control. No se observaron diferencias significativas en la actividad respiratoria (IE) de los fagocitos de peces control e infectados (DA y DB) durante el periodo en estudio.

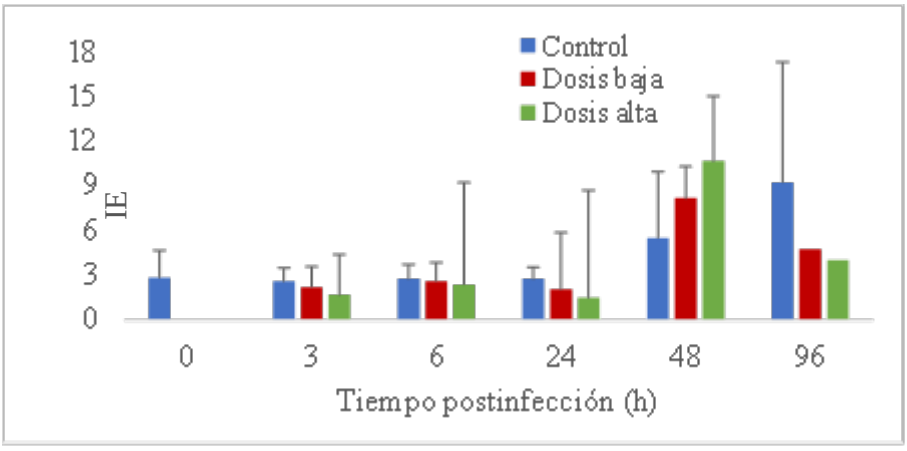


Figura 32. Actividad respiratoria (IE) de los fagocitos del riñón de rodaballos control e infectados con A. salmonicida spp. *salmonicida.IE=GMFI de leucocitos estimulados/GMFI de leucocitos no tratados.*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.2.4. Estudio de la respuesta humoral innata

5.2.4.1. Actividad lisozima

El análisis de los sueros de peces infectados experimentalmente con *A. salmonicida* se muestra en la Figura 33. La actividad lisozima del suero de peces infectados experimentalmente con *A. salmonicida* disminuyó con respecto a los valores observados en peces control en las tres primeras horas posteriores a la infección, aumentando hasta alcanzar valores similares o ligeramente superiores a los del suero de peces control desde las 6h a las 24h post infección. En los muestreos siguientes no se observaron diferencias significativas (ANOVA, $p<0,05$) en los niveles de lisozima entre peces control e infectados.

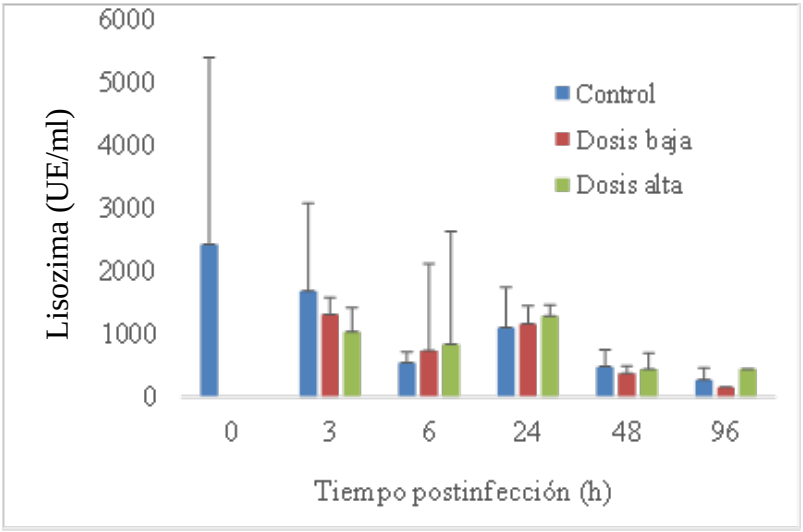


Figura 33. Actividad lisozima del suero de rodaballos control e infectados con A. salmonicida spp. salmonicida.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.2.4.2. Actividad bactericida

Los sueros de los peces infectados experimentalmente con *A. salmonicida*, (DA y DB) mostraron un incremento no significativo ($p<0,05$) en la actividad bactericida (DB, IB=0,35; DA, IB=0,42) con respecto a los peces control (IB=0,51) a partir de las 3 h postinfección (Figura 34). Esta capacidad bactericida se redujo a valores inferiores a los encontrados en el suero de peces control (IB=0,27-0,30) a partir de las 24h (peces infectados con DA, IB=0,35) y 48h (DA, IB=0,37 y DB, IB=0,47) posteriores a la infección. No se detectaron diferencias significativas entre peces control e infectados en la actividad bactericida del suero durante el periodo analizado (0 a 96h).

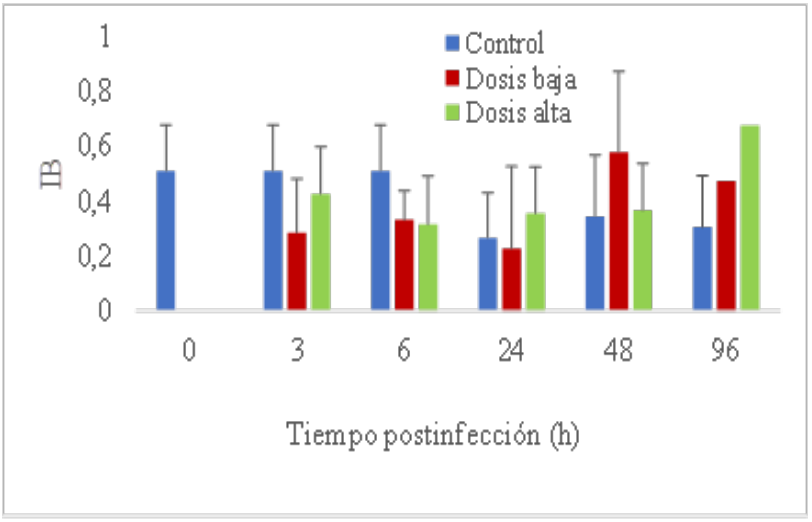


Figura 34. Actividad bactericida del suero de rodaballos control e infectados con A. salmonicida spp. salmonicida. IB= A620 muestra tratada con suero/A620 del control negativo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.3.DISCUSIÓN

Los análisis de sangre pueden proporcionar información sustancial sobre los aspectos fisiológicos del bienestar animal, incluido el estado de activación del sistema inmunitario, los efectos agudos y a largo plazo de las condiciones de cultivo adversas y las posibles enfermedades. En el caso de los animales domésticos y de granja terrestres, los análisis hematológicos y bioquímicos son una práctica habitual que proporciona información diagnóstica sustancial sobre el estado fisiológico y de salud del animal. Sin embargo, la sangre de los peces no se analiza todavía de forma rutinaria para la evaluación de la salud y/o el bienestar de los peces en cultivo (Fazio, 2019; Martins y col., 2004; Seibel y col, 2021), debido probablemente a la falta de valores de referencia para los parámetros hematológicos y bioquímicos en animales sanos.

En el presente estudio se ha valorado en primer lugar el efecto de la infección experimental de rodaballos con una cepa de la especie *A. salmonicida* sobre dos parámetros hematológicos, el hematocrito y los niveles de hemoglobina. Los valores de hematocrito y hemoglobina observados en el presente estudio son comparables a los descritos para rodaballo sanos por otros investigadores (Failde y col, 2014; Pichavant y col, 2003). Durante el período de tiempo analizado (96 h postinfección) no se observaron diferencias significativas ($p<0,05$) en el valor del hematocrito y niveles de hemoglobina entre peces infectados y peces control. Estos resultados concuerdan con los descritos previamente en salmón Atlántico (Powell y col, 2005) y rodaballo (Failde y col, 2014) infectados experimentalmente con *Tenacibaculum maritimum*. En contraste, otros investigadores han descrito variaciones en el valor hematocrito en tilapias infectadas experimentalmente con *Enterococcus* (Martins y col, 2008),

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Streptococcus iniae (McNulty y col, 2003; Chen y col, 2004), y *Streptococcus agalactiae* (Alsaid y col., 2015), en salmónidos infectados con *Piscirickettsia salmonis* (Isla y col, 2022), *Aeromonas salmonicida* (Foda, 2011) y *L. anguillarum* (Lamas y col, 1994). Las diferencias descritas pueden deberse a la diferente respuesta de los peces a los patógenos o a diferencias en las condiciones de experimentación (dosis y método de infección, talla de los peces, condiciones ambientales durante el experimento o período postinfección evaluado) utilizadas en los estudios descritos.

Al igual que otros animales vertebrados, los peces tienen una serie de mecanismos humorales y celulares específicos (inmunidad adquirida) y no específicos (inmunidad innata) que actúan de forma complementaria con el fin de proteger al organismo de agentes patógenos (Dalmo y col., 1997; Ellis, 1999; Scapigliati y col., 1999; Dixon y Stet, 2001; Watts y col., 2001; Tort y col., 2003; Magnadóttir, 2006; Godoy, 2010; Gómez y col, 2013; Rauta y col, 2012; Secombes y Wang, 2012).

Los mecanismos de defensa inespecíficos, presentes en todos los seres vivos desde su nacimiento, están formados por componentes celulares y humorales que se activan en respuesta a propiedades químicas inherentes al agente agresor o elaborados por éste.

La inmunidad innata incluye las barreras naturales o físicas, tales como el moco y los epitelios, que impiden o dificultan la penetración de los microorganismos, factores solubles que constituyen la defensa humoral inespecífica y varios tipos celulares que constituyen la defensa celular inespecífica (Dalmo y col., 1997; Ellis, 1999; Rauta y col, 2012).

En el presente estudio hemos evaluado algunos parámetros de la respuesta inmune humoral innata (actividades lisozima y bactericida del suero) en peces control sanos y en peces infectados experimentalmente

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

con *A. salmonicida*, con el fin de establecer métodos rápidos, fiables y no cruentos para evaluar el estado sanitario de los peces.

Los resultados del estudio demostraron que la infección experimental con *A. salmonicida* provoca un incremento de la actividad lisozima con respecto a los valores observados en el suero de peces control durante las primeras 24h postinfección, reduciéndose posteriormente la actividad a valores iguales o inferiores a los observados en peces control. La actividad bactericida observada en los rodaballos infectados experimentalmente con *A. salmonicida* en el presente estudio sigue un patrón de respuesta similar al de la actividad lisozima y muestra valores del orden de los descritos en rodaballo y otras especies de peces infectados con *Aeromonas* spp., *Vibrio pelagius*, *Edwardsiella tarda* o *Mycobacterium* spp (Siwicki y Studnicka, 1987; Moyner y col, 1993, Villamil y col, 2003; Kim y col, 2020) o tratados con antígenos bacterianos y de protozoos ciliados (Ackerman y col., 2000; Sitjà-Bobadilla y col., 2003; 2008), productos extracelulares bacterianos e inmunoestimulantes (Santarén, 1997).

Los fagocitos son unos de los principales componentes de inmunidad innata celular y el vínculo entre la respuesta inmunitaria innata y adaptativa. Los fagocitos aparecen de manera temprana en los procesos inflamatorios contribuyendo a combatir la infección y, en algunos casos, protegen al patógeno frente a la acción del sistema inmune, facilitando a su diseminación a los diferentes órganos del individuo afectado (Pulido 2004, Penagos, 2008). Los macrófagos, además de los neutrófilos, son la primera línea de defensa de los vertebrados, incluidos los peces. Tras la infección, los fagocitos se activan y secretan péptidos antimicrobianos, citoquinas y quimiocinas, entre otras moléculas moduladoras del sistema inmunitario. Los macrófagos activados tienen una mayor actividad fagocítica. Una vez internalizados los microorganismos se forma el fagosoma, en cuyo

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

interior se produce la destrucción y digestión del material fagocitado gracias a la acción de metabolitos tóxicos (intra o extracelulares) dependientes o independientes del oxígeno producidos por los fagocitos mediante el mecanismo conocido como estallido respiratorio o explosión oxidativa. En el presente estudio se ha observado que la actividad respiratoria de los granulocitos de rodaballos infectados experimentalmente con diferentes dosis (DA y DB) de *A. salmonicida* spp *salmonicida* aumentaba por encima de los valores observados en peces control transcurridas 48h postinfección, retornando a valores inferiores a los de los peces control a las 96h postinfección. Estos resultados indican que los macrófagos del rodaballo son capaces de detectar *A. salmonicida* y desencadenar una respuesta. Sin embargo, la recuperación de la bacteria a partir de los tejidos de peces infectados transcurridas 96h postinfección sugiere que *A. salmonicida* controla la respuesta inmune celular para evitar su eliminación durante la infección temprana.

La respuesta inmunitaria innata es una respuesta rápida a la presencia de patógenos y desencadena múltiples mecanismos y redes de acción, como la producción de sustancias antimicrobianas y proteínas de fase aguda, la activación de la vía alternativa del complemento, la liberación de citoquinas, la inflamación y fagocitosis, y finalmente da paso al desarrollo de una respuesta adaptativa. Es posible que, tras un tiempo de contacto con el patógeno, los niveles de actividad de la lisozima y bactericida del suero disminuyan dando paso a otros mecanismos de defensa. Esto explicaría el descenso de las actividades bactericida y lisozima del suero de peces infectados, así como el incremento de la actividad respiratoria de los fagocitos a lo largo del periodo post infección evaluado en el presente estudio.

En un estudio de infección experimental de rodaballo con la misma cepa de *A. salmonicida* (TO96.7.1) (Coscelli y col, 2014) demostraron

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

la localización del antígeno bacteriano en el citoplasma de monocitos/macrófagos, indicando que estas células participan en la rápida captación de las bacterias vivas y en la respuesta inmunitaria temprana contra la infección por *A. salmonicida.* En este mismo estudio y mediante el uso de técnicas inmunohistoquímicas los autores describieron la existencia de inmunotinción intracelular difusa en los fagocitos del rodaballo, compatible con su función en la eliminación de patógenos y pequeños gránulos positivos en el interior de los macrófagos que podrían representar grupos de bacterias recientemente fagocitadas o la persistencia intracelular de las bacterias en los fagocitos. La capacidad de internalización de las cepas de *A. salmonicida* y su potencial supervivencia en los macrófagos de los peces y en otras células, ha sido descrita previamente (Daly et al., 1996; Fast et al., 2009; Garduño y Kay, 1992; 1995; Garduño et al., 2000) en base a estudios *in vitro* e *in vivo* y se ha sugerido que A. *salmonicida* puede utilizar los fagocitos como mecanismo de evasión de la respuesta inmunitaria.

Sería interesante analizar los parámetros inmunológicos y hematológicos en peces afectados de furunculosis, así como en peces con enfermedad subclínica, con el fin de confirmar la utilidad de estos parámetros en el diagnóstico de las enfermedades causadas por *A. salmonicida* y como indicadores del estado de bienestar de los peces.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 6

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

6 VACUNACIÓN: EFECTO DE LA VACUNA Y VÍA DE ADMINISTRACIÓN

6.1.MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.1. Peces utilizados y condiciones de mantenimiento

En los experimentos de vacunación se utilizaron rodaballos con pesos medios de 5 y 50 g. Los peces se obtuvieron de una granja de rodaballo en Galicia (noroeste de España). Los peces se mantuvieron en agua de mar filtrada por arena y mantenida a 15 ºC con un contenido de oxígeno superior a 8 mg/l) y una salinidad de 32‰.

6.1.2. Vacunas utilizadas

Se utilizaron las vacunas comerciales de base acuosa Aquavac Furovac 5 y Aquavac Furovac 5 oral, originalmente diseñadas para peces salmónidos (Aquaculture Vaccines Ltd, Saffron Walden, Reino Unido), la vacuna de base oleosa Alpha Ject 1200 (Alpharma, AS, Oslo, Noruega) y una autovacuna de base acuosa (Tabla 16).

La autovacuna se preparó con la cepa TO96.7.1 de *A. salmonicida* ssp. *salmonicida*. Para la producción de la vacuna, la cepa TO96.7.1 se cultivó en 100 mL de caldo de triptona de soja suplementado con 1% de NaCl (p/v) (TSB-1), y 10 mL de este cultivo se inocularon en un volumen de 1 L de TSB-1 y se incubaron durante 48 h a 20 ºC con agitación a 100 rpm. Previamente a la inactivación se tomó una muestra de la suspensión bacteriana para determinar el número de células

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

viables y la pureza del cultivo. Los cultivos se inactivaron mediante la adición de formaldehido al 0,3% (v/v) con incubación a temperatura ambiente durante 2 h y a 4 ºC durante 24 h. Los cultivos inactivados se ajustaron a una concentración de $5x10^9$ células mL) (absorbancia a 580 nm de 0,7). La inactivación se confirmó por la ausencia de crecimiento tras la siembra de 1 mL de la vacuna inactivada en medio TSB-1 e incubación a 20º C durante 48 h. La esterilidad de la vacuna inactivada se confirmó por la ausencia de crecimiento bacteriano después de la inoculación en TSA-1 de una alícuota de 0 1 mL de la bacterina e incubación a 20 ºC durante 48 h. La inocuidad de la vacuna se comprobó siguiendo los procedimientos descritos en las monografías publicadas por la Comisión de la Farmacopea Europea para las vacunas anti-furunculosis y anti-vibriosis para peces salmónidos (EPCM, 2002 a y b). Con este fin, se evaluó durante 21 días el efecto de la vacuna administrada por inyección intraperitoneal (0,2 ml de la vacuna no diluida) o inmersión (baño en la vacuna diluida 1:5) a una dosis doble a la recomendada para su uso en rodaballo. Los peces se examinaron durante un período de 21 días y sólo se consideró inocua la vacuna cuando no se observaron signos de daño durante el período de ensayo.

6.1.3. Procedimientos de vacunación

Las vacunas se administraron por baño corto (inmersión durante 1 minuto en la vacuna diluida 1:10 en el agua del tanque), por inyección intraperitoneal de 0,1 ml de la vacuna sin diluir, o incorporadas en el alimento al 1% del peso corporal por día durante un periodo de 10 días siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Las inmunizaciones primarias y de refuerzo se llevaron a cabo utilizando protocolos idénticos. A los respectivos grupos de control de peces se les inyectó 0,1 ml de tampón fosfato estéril (PBS, pH 7,4;

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Sigma), se les sumergió durante 1 minuto en agua de mar o se les alimentó con pellets secos comerciales estándar, según el procedimiento de vacunación probado. Las vacunas y los procedimientos de vacunación utilizados se enumeran en la Tabla 16.

Para cada régimen de vacunación se seleccionaron peces con el peso corporal medio que serían utilizados en las granjas de cultivo (peces de aproximadamente 5 g para los procedimientos de inmersión y 50 g para los de inyección).

Cuando se evaluaron las vacunas en condiciones de laboratorio, los distintos grupos de peces control y vacunados se mantuvieron en tanques paralelos (longitud 115 - anchura 96 - profundidad 65 cm). Para los estudios de campo, los grupos de peces vacunados y de control se mantuvieron en tanques paralelos (longitud 400 - anchura 400 - profundidad 65 cm) en una granja. Los peces se alimentaron con pienso comercial durante los experimentos.

Ensayos de laboratorio

Experimento 1

En este experimento se inmunizaron doscientos peces (5 g) con la vacuna Aquavac Furovac 5 y 50 con la autovacuna, utilizando el procedimiento de inmersión descrito anteriormente. Un mes más tarde, se administró la dosis de recuerdo por inmersión con las mismas vacunas. Un grupo de 100 peces vacunados con la vacuna comercial se envió a una granja en la que se había aislado *A. salmonicida* de forma habitual como agente causante de mortalidades y se realizó *in situ* la infección experimental por inyección, transcurridos dos meses desde la primera inmunización.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 16. Vacunas y procedimientos de inmunización utilizados en los ensayos de laboratorio y en campo.

Tipo de estudio	Vacunas utilizadas	Dosis primaria	Dosis de refuerzo	Nº peces	Reto (Días)
		Ensayo de laboratorio			
Experimento 1	Aquavac	Baño	Baño	25	60
	Furovac 5		Baño	25	60
	Autovacuna	Baño		25	60
	Control			25	60
	Aquavac Furovac 5	Baño	Baño	75	180
	Autovacuna	Baño	Baño	25	180
	Control			75	180
	Aquavac Furovac 5	Baño	Baño	100	60
	Control			100	60
Experimento 2	Aquavac				
	Furovac 5	Inyección	–	40	120
	Autovacuna	Inyección	–	40	120
	Control			40	120
	Aquavac				
	Furovac 5	Inyección	–	40	180
	Autovacuna	Inyección	–	40	180
	Control			40	180
		Ensayo de campo			
Experimento 1	Autovacuna	Inyección	–	50	180
	Autovacuna	Inyección	Inyección	50	
	Autovacuna + Aquavac Furovac5 oral	Inyección	Oral	50	180
	Control			50	180
Experimento 2	Alpha Ject 1200	Inyección	–	20	630
	Autovacuna	Inyección	–	20	630
	Control			20	630

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Un centenar de peces del grupo de control no vacunado se reservaron en condiciones de laboratorio y se trasladaron a la granja cuatro días antes de la prueba. El resto de los peces vacunados y control se mantuvieron en el laboratorio y se sometieron a una infección experimental 60 días (25 peces de cada grupo experimental) y 6 meses después de la vacunación inicial (25 peces vacunados con la autovacuna, 75 peces vacunados con Aquavac Furovac 5 y 75 peces del grupo control) (Tabla 16).

Experimento 2

En este experimento se inmunizaron mediante inyección de la vacuna Aquavac Furovac 5 y con la autovacuna grupos de 80 peces (50 g de peso corporal). Transcurridos, cuatro y seis meses desde la inmunización inicial se realizó la infección experimental utilizando grupos iguales de peces vacunados y control (Tabla 16).

Ensayos de campo

El estudio de campo se llevó a cabo en una granja en la que la incidencia de furunculosis había sido elevada en años anteriores. Al inicio del estudio, el peso medio de los peces experimentales era de 50 g. Se realizaron dos experimentos diferentes:

Experimento 1

En este experimento se inmunizaron 28.000 rodaballos por inyección con la autovacuna y, 3 meses después, se administró una dosis de recuerdo por inyección con la autovacuna (8.000 peces) o por vía oral con la vacuna Aquavac Furovac 5 oral (9.000 peces) y monitorizado durante 1 año. Los dos grupos de peces vacunados y el grupo de control se mantuvieron en tanques paralelos en las condiciones

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

descritas anteriormente y se monitorizaron durante 1 año. Seis meses después de la primera vacunación, 50 peces de cada grupo experimental y 50 peces de control se infectaron experimentalmente (Tabla 16).

Experimento 2

Un total de 92.000 rodaballos se vacunaron con la autovacuna (62.000 peces) y con la vacuna comercial a base de aceite Alpha Ject 1200 (30.000 peces) mediante inyección i.p. y se monitorizaron durante 2 años hasta que alcanzaron la talla comercial. Veintiún meses después, 20 peces de cada grupo experimental y 20 peces de control se infectaron experimentalmente (Tabla 16).

6.1.4. Eficacia de la vacunación

La eficacia de la vacunación se evaluó mediante infecciones experimentales (estudios de laboratorio y de campo) y registrando la mortalidad de los peces causada por la furunculosis (estudios de campo). Para los desafíos experimentales se utilizó la cepa TO96.7.1 de *Aeromonas salmonicida*. La virulencia de la cepa bacteriana para los rodaballos de diferentes pesos medios se evaluó antes de la realización del reto infeccioso, determinando la DL_{50} mediante la administración por vía intraperitoneal. de varias dosis bacterianas. La cepa virulenta, recuperada de los peces moribundos durante estos ensayos de patogenicidad, se utilizó para infectar experimentalmente a los peces vacunados y a los peces de control. Los retos infecciosos se realizaron por inyección intraperitoneal utilizando una dosis equivalente al doble de la DL50 (2xDL50) en 0,1 mL de PBS. El número de unidades formadoras de colonias (UFC) se determinó por siembra en placas de 0,1 mL de las diluciones decimales seriadas de la suspensión bacteriana y recuento del número de colonias desarrolladas sobre la superficie del medio TSA-1.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La mortalidad en los peces control y vacunados se registró diariamente durante 21 días desde el inicio de las mortalidades y se analizaron muestras de los órganos internos de los peces inoculados para confirmar la causa de la muerte.

La eficacia de la vacunación se evaluó calculando el porcentaje relativo de supervivencia (RPS) (Amend, 1981), según la formula:

$$RPS = \left(1 - \frac{\%\ mortalidad\ en\ vacunados}{\%\ mortalidad\ no\ vacunados}\right) x\ 100$$

Para analizar las diferencias en supervivencia entre peces vacunados y control tras el desafío, se utilizó la prueba de chi-cuadrado utilizando un nivel de significación de $P < 0,05$.

Para determinar el efecto de la vacunación en condiciones de campo (experimentos 1 y 2), se tomaron muestras de peces muertos o con signos de furunculosis de los tanques experimentales y se sometieron a análisis bacteriológicos para confirmar el diagnóstico. Las cepas bacterianas aisladas se identificaron mediante el sistema API 20E (bioMe'rieux, Marcy l'Etoile, Francia) y se confirmaron mediante PCR y ensayo dot blot.

6.1.5. Respuesta inmunitaria específica

Veintiocho, 60, 120 y 180 días después de la administración de las vacunas (autovacuna o Aquavac Furovac 5), se extrajo sangre de ocho a diez rodaballos de los grupos vacunados y de control. Se dejó coagular la sangre, se separó el suero por centrifugación (3000xg, 10 min) y se almacenó sin diluir en alícuotas congeladas a -30 ºC hasta su utilización.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Los niveles de anticuerpos del antisuero se determinaron mediante el ensayo ELISA doble indirecto optimizado en este estudio. El ELISA se llevó a cabo en placas de fondo plano (Corning) utilizando el antígeno CBF de la cepa TO96.7.1. Los valores de absorbancia se determinaron utilizando un lector de microplacas (Titertek Multi- scan plus, Labsystems, Helsinki, Finlandia) ajustado a una longitud de onda de 492 nm. Una reacción positiva se fijó en una DO≥0,2 después de restar los valores de los controles negativos (muestras de rodaballo no vacunado).

Además, se ha utilizado la técnica DDG para determinar si los sueros de rodaballos vacunados con la autovacuna y la vacuna Aquavac Furova 5 detectan los antígenos de la envoltura celular (proteínas y LPS) de cepas de *A. salmonicida* con diferente origen y si los anticuerpos de los sueros probados reconocen el mismo complejo antigénico. La técnica se realizó como se describió en el apartado 4.1.4.2, depositando 10 µl de los antígenos (LPS o proteínas) en los pocillos periféricos y 10 µl de los antisueros obtenidos de rodaballos control y vacunados en el pocillo central (identificación de antígenos inmunogénicos) y depositando 10 µl del antígeno CBF en el pocillo central y 10 µl de los sueros de rodaballos control y vacunados en los pocillos periféricos. En ambos análisis los resultados se revelaron mediante tinción con azul Coomasie (apartado 4.1.4.2).

6.2.RESULTADOS

6.2.1. Eficacia de la vacunación: ensayos de laboratorio

La eficacia de las vacunas y de los procedimientos de inmunización en condiciones de laboratorio, se evaluaron comparando los porcentajes de supervivencia tras la realización de un reto infeccioso y los niveles

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de anticuerpo en sangre de los peces vacunados y control. Los resultados de estos experimentos (experimentos 1 y 2) se muestran en la (Tabla 17). En todos los casos, excepto en el de los peces vacunados dos veces por inmersión con Aquavac Furovac 5 (estudio de laboratorio) y en el de los peces vacunados por inyección con la autovacuna y revacunados con Aquavac Furovac 5 oral (estudio de campo), las diferencias de supervivencia entre los peces vacunados y los de control fueron estadísticamente significativas según el análisis de chi-cuadrado (Tabla 17).

Los resultados del experimento 1 mostraron que la autovacuna y la vacuna Aquavac Furovac 5, administradas por inmersión (dos dosis), confirieren niveles de protección bajos o moderados (RPS=22-38%) cuando los peces (30-35 g de peso corporal) se infectan experimentalmente con la cepa TO96.7.1. (Dosis=$1{,}5x10^8$ cel/ml) 60 días después de la primera vacunación. Se observaron valores de RPS aún más bajos (0-9%) seis meses después de la administración de la dosis inicial de vacuna, cuando los peces (65-70 g de peso corporal) se infectaron con una dosis bacteriana de $8x10^8$ cel/ml.

El grupo de 100 peces que fueron vacunados por inmersión dos veces y luego trasladados a una granja con una alta incidencia de furunculosis mostraron niveles de protección más altos (RPS= 83%, Tabla 17) tras la infección experimental por inyección ($3{,}1x10^9$ cel/ ml) que los obtenidos con los peces vacunados dos veces por inmersión y luego mantenidos en condiciones de laboratorio (RPS=22- 38%,Tabla 17).

Los resultados del experimento 2 mostraron que 4 meses después de la vacunación con Aquavac Furovac 5 o con la autovacuna, administradas por inyección, los peces (250-300 g de peso corporal) mostraban altos niveles de protección (RPS=72-99%) después del desafío con la cepa TO06.7.1 ($3{,}2x10^{10}$ cel/ml). Sin embargo, se

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

registró un valor de RPS de 50-52% cuando los peces (350-400 g de peso corporal) se retaron por inyección con la misma cepa (5,8 -x10^{10} cel/ml) 6 meses después de la vacunación.

Con el fin de evaluar si existe relación entre la presencia de anticuerpos en sangre y el grado de protección de los peces frente a la furunculosis se determinaron los niveles de anticuerpo en sangre mediante el inmunoensayo enzimático doble indirecto optimizado. La prueba ELISA reveló que los niveles más elevados de anticuerpos frente a *A. salmonicida* (mayor absorbancia a 492nm, A492) se encontraron en los peces vacunados por inyección intraperitoneal y dichos niveles variaban ligeramente en función de la formulación de la vacuna probada (Figura 35).

Los niveles de anticuerpos en el suero de los rodaballos oscilaron entre 0,320 y 1,001 para los vacunados por inyección (Figura 35) y entre 0,008 y 0,024 para los peces vacunados por inmersión (Figura 35). Seis meses después de la vacunación, los niveles de anticuerpos habían descendido a valores inferiores (A492=0,840) en los peces vacunados por inyección. y eran indetectables en los peces vacunados por inmersión. No se detectaron diferencias entre los niveles de anticuerpos obtenidos tras una vacunación simple o doble por inmersión (Figura 36).

El análisis mediante DDG demostró que los sueros de peces inmunizados con la autovacuna y la vacuna Aquavac Furovac 5 administradas por inyección reconocen los antígenos proteicos y lipopolisacarídicos de cepas de *A. salmonicida* de diferente origen (Figura 37) y que ambos antisueros reconocen el mismo complejo antigénico (Figura 38).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 17. Eficacia de las vacunas y procedimientos de vacunación frente a la furunculosis en rodaballo.

Tipo de estudio	**Vacuna**	Procedimiento de vacunación		Reto (días)	% Mortalidad	RPS[a]
		1ª Dosis	2º Dosis			
Ensayo de laboratorio						
Experimento 1	Aquavac Furovac 5	**baño**	**baño**	**60**	**56**	22
	Autovaccine	**baño**	**baño**	60	44	38[c]
	Control			**60**	72	
	Aquavac Furovac 5	**baño**	**baño**	180	**100**	0
	Autovaccine	**baño**	**baño**	**180**	**91**	9
	Control			**180**	**100**	
	Aquavac Furovac 5	**baño**	**baño[b]**	**60**	**15**	83 [c]
	Control			**60**	**87**	72 [c]
Experimento 2	Aquavac Furovac 5	**Inyección**	-------	**120**	**26**	**99** [c]
	Autovacuna	**Inyección**	-------	**120**	**1**	
	Control			**120**	**95**	
	Aquavac Furovac 5	**injection**	-------	**180**	**25**	52 [c]
	Autovacuna	**Inyección**	-------	**180**	**26**	**50** [c]
	Control			**180**	**53**	
		Ensayo de campo				
Experimento 1	Autovacuna	**Inyección**	-------	**180**	**48**	**50**
	Autovacuna	**Inyección**	**Inyección**	**180**	**40**	**58**
	Autovacuna+Aquavac Furovac5 oral	**Inyección**	**Oral**	**180**	**88**	**8**
	Control			**180**	**96**	
Experimento 2	AlphaJet 1200	**Inyección**	-------	**630**	**9**	**83** [c]
	Autiovacuna	**Inyección**	-------	**630**	**8**	**85** [c]
	Control			**630**	**52**	

[a] Porcentaje relativo de supervivencia (RPS) = 1 - (% Mortalidad peces vacunadosh/% Mortalidad en peces control) x 100.
[b] Peces vacunados por inmersión (2 dosis) de Aquavac Furovac 5 y mantenidos en una granja con elevada incidencia de furunculosis.
[c] Efecto de la vacunación [percentaje de supervivencia de peces vacunados con respecto al grupo control tras el reto infeccioso: significativo, $\chi 2 > 3.841$ (n =1, $P < 0.05$)].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

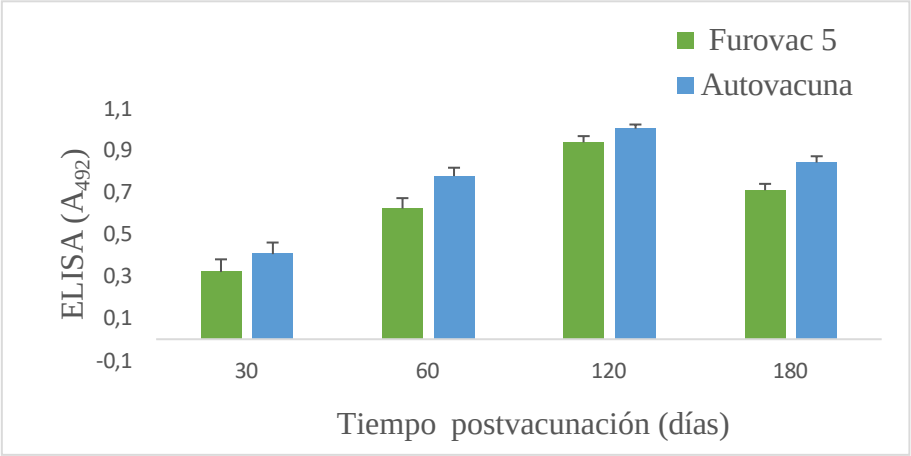


Figura 35. Evolución de los niveles de anticuerpos (A492) en rodaballos inmunizados por inyección con la vacuna Aquavac Furovac 5 y la autovacuna.

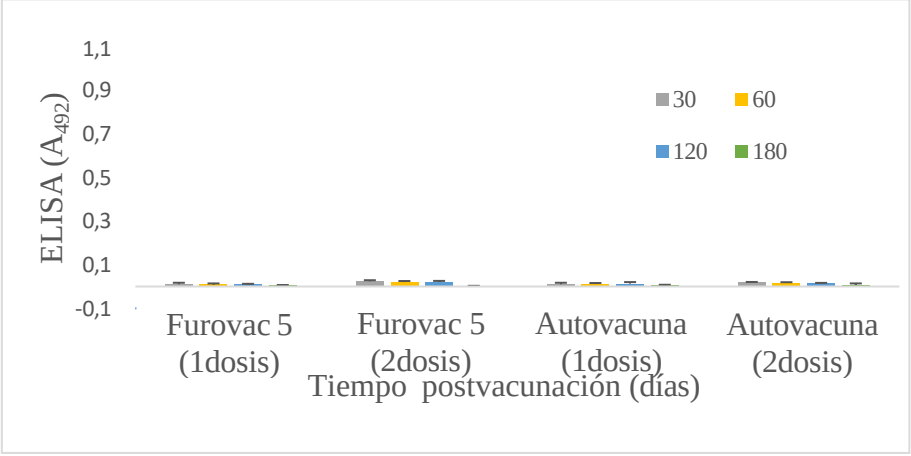


Figura 36. Evolución de los niveles de anticuerpos (A492) en rodaballos inmunizados por inmersión con la vacuna Aquavac Furovac 5 y la autovacuna.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

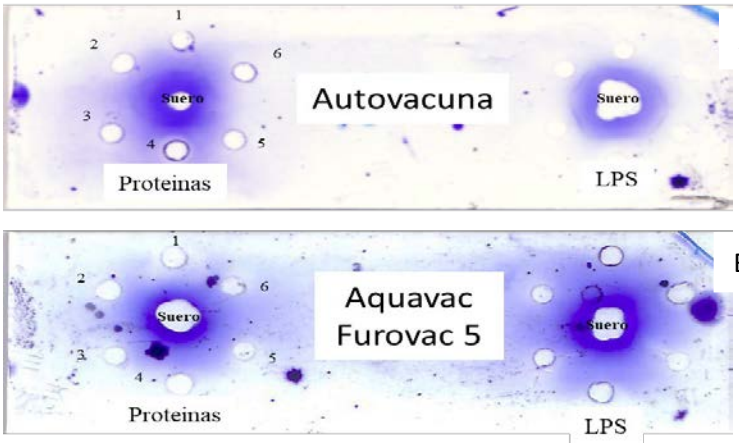


Figura 37. Reactividad de los sueros de peces inmunozados con autovacuna (A) y Aquavac Furovac 5 (B) con los antígenos (proteínas y LPS) de cepas de A. salmoinicida de diferente origen. Pocillos: centrales, sueros peces vacunados con autovacuna (A) y Aquavac Furovac 5 (B); 1 y 2, antígenos de cepas de salmónidos; 3 y 4, antígenos de cepas de lamprea; 5 y 6, antígenos de cepas de rodaballo.

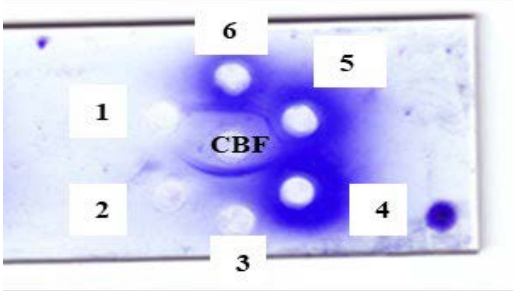


Figura 38. Reactividad de los antígenos de la cepa TO96.7.1 frente a suero control de rodaballo (1) y antisueros obtenidos en conejo (3), rodaballo (6) y suero de rodaballos inmunizados con la autovacuna (4 y 5) y la vacuna Aquavac Furovac 5 (2).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.2.2. Eficacia de la vacunación: ensayos de campo

La eficacia del uso de vacunas y procedimientos de inmunización contra la furunculosis se evaluó también en rodaballos mantenidos en las condiciones de cultivo habituales en la granja de producción. En concreto se determinó si el uso de vacunas adyuvantadas con aceite o de una dosis de refuerzo puede aumentar la protección contra la furunculosis en condiciones de campo. El ensayo para investigar el efecto de una dosis de refuerzo en la protección (Experimento 1) mostró que ni la inyección con la autovacuna ni la administración oral de la vacuna Aquavac Furovac 5 oral mejoraban el grado de protección (Tabla 17). De hecho, los peces que recibieron un refuerzo oral experimentaron una mayor mortalidad que los que no lo hicieron o fueron reforzados mediante inyección (Tabla 17).

El efecto de la composición de las vacunas en la duración de la protección en condiciones de campo se evaluó registrando la mortalidad de los peces causada por la furunculosis a lo largo del experimento (24 meses) y mediante el desafío experimental de los peces 21 meses después de la vacunación con vacunas de base oleosa (Alpha Ject 1200) y acuosa (autovacuna).

Durante el periodo de estudio, se observaron tasas de mortalidad del 20% entre los peces vacunados con Alpha Ject 1200 y la autovacuna y superiores al 40% en los peces de control no vacunados. El nivel de protección encontrado tras el desafío experimental en estos grupos de peces que llevaban 21 meses en la granja tras la inmunización fue también elevado y similar para ambas preparaciones vacunales (RPS > 80%).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.3.DISCUSIÓN

La furunculosis causada por *A. salmonicida* ssp. *salmonicida* es una de las principales causas de mortalidad del rodaballo cultivado en sistemas intensivos en el noroeste de España y Portugal (Santos, 2005; Toranzo y col, 2005). Por lo tanto, es necesario desarrollar programas de vacunación eficaces para reducir las importantes pérdidas económicas debidas a la enfermedad.

En el presente estudio, se comprobó en primer lugar el grado de protección y la respuesta inmunitaria inducida tras la inmunización del rodaballo con dos formulaciones vacunales de base acuosa, la vacuna comercial Aquavac Furovac 5 (desarrollada para peces salmónidos) y una autovacuna (producida con una cepa aislada del rodaballo), administradas por inmersión o por inyección intraperitoneal

Los ensayos de vacunación a escala de laboratorio demostraron claramente que la administración por inyección de una única dosis de ambas vacunas protege al rodaballo frente a una infección experimental con *A. salmonicida* ssp. *salmonicida* con niveles de protección significativamente altos (RPS=72-99%) transcurridos cuatro meses después de la inmunización. Los mejores valores de RPS se obtuvieron cuando se administró la autovacuna (RPS > 99%), lo que puede reflejar la presencia en ésta de antígenos específicos característicos de los aislados de rodaballo que son importantes en la estimulación del sistema inmunitario de esta especie de pez. Además, la reducción de los valores de RPS al 50% seis meses después de la vacunación indica que una sola dosis de vacuna administrada por inyección no es capaz de proteger al rodaballo contra la furunculosis durante todo el ciclo de producción. Por lo tanto, son necesarias otras estrategias de vacunación para lograr una protección a largo plazo.

Estudios anteriores indican que la administración por inmersión de dos dosis de vacuna es suficiente para lograr la protección en peces de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

diferentes especies vacunados frente a *Photobacterium damselae* ssp. *piscicida* y *Vibrio anguillarum* (Santos y col, 1991c; Magariños y col, 1994; Gravningen y col, 1998; Palm y col, 1998). Sin embargo, en el presente estudio se observó que ni la autovacuna ni la vacuna comercial Aquavac Furovac 5 administradas por inmersión (una o dos dosis) fueron capaces de inducir niveles significativos de protección contra *A. salmonicida* en el rodaballo.

Los estudios realizados en la anguila europea, *Anguilla anguilla* L. (Collado y col, 2000) han demostrado que es necesaria la administración de tres dosis por inmersión prolongada para lograr una buena protección contra *Vibrio vulnificus* serovar E (biotipo 2). Los altos niveles de protección (RPS= 83%) encontrados en el grupo de 100 rodaballos que fueron vacunados dos veces por inmersión con la vacuna comercial y luego expuestos naturalmente a la bacteria en el entorno de la granja sugieren que podría ser necesaria una triple exposición a los antígenos de *A. salmonicida* para lograr una protección significativa por inmersión.

Además, aunque es difícil precisar por qué algunas vacunas muestran una eficacia elevada y otras una eficacia baja, debe tenerse en cuenta que existen muchas variables que pueden influir en la eficacia de la vacuna y deben ser consideradas cuando se realizan ensayos de vacunación por inmersión (Bogwald y Dalmo, 2019). Estos factores incluyen la dosis de vacuna (cantidad de antígeno), el tipo de antígeno (particulado/soluble), la duración de la inmersión (baño corto o prolongado), la temperatura del agua durante la inmunización, el tamaño de los peces (edad), integridad de la mucosa y la forma en que se llevan a cabo los desafíos experimentales (Bogwald y Dalmo, 2019; Mondal y Thomas, 2022).

Los anticuerpos presentes en el suero de los peces constituyen una defensa humoral específica al inhibir la adherencia bacteriana o la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

invasión de las células no fagocíticas del huésped y neutralizar la toxina bacteriana (Bricknell y col, 1999; Ellis 1999). Los resultados de nuestros estudios de laboratorio muestran que los niveles de anticuerpos fueron altos o moderados en los peces vacunados por inyección con las diferentes vacunas y muy bajos o casi ausentes en los peces vacunados por inmersión. La influencia de la vía de inmunización en la intensidad de la respuesta de anticuerpos también se ha descrito en otras especies de peces como la trucha arco iris (Palm y col, 1998), y la anguila europea (Collado y col, 2000). Además, el presente estudio encontró que 6 meses después de la vacunación la resistencia a un desafío con *A. salmonicida* en los peces vacunados por inyección disminuyó a valores de RPS de 50-52% en paralelo con la reducción de la cantidad de anticuerpos contra el antígeno CBF de la cepa TO96.7.1 (valores de Absorbancia a 492 nm que oscilan entre 0,709 y 0,840). Estos resultados sugieren que, además de los anticuerpos, otros tipos de respuesta, como los mecanismos de defensa humoral no mediados por inmunoglobulinas o la inmunidad mediada por células, están implicados en la protección del rodaballo contra la furunculosis.

Con el fin de establecer un programa de vacunación frente a la furunculosis eficaz para su uso en las granjas de cultivo de rodaballo, se evaluó el efecto sobre la protección de la administración de una dosis de refuerzo y del uso de vacunas adyuvantadas con aceite. A diferencia de lo descrito para peces salmónidos (Midtlying y col, 1996 a y b; Durbin y col, 1999), nuestro estudio de campo demostró que la administración de una dosis de refuerzo por vía oral tras la vacunación primaria por inyección reducía el nivel de protección del rodaballo contra la furunculosis. Estudios previos han descrito que la administración simultánea de gammaglobulina humana por inyección e incorporada en el pienso, inducen tolerancia en la trucha (Davidson y col, 1994; Mutoloki y col., 2015). Los resultados del presente estudio demostraron que la administración de Aquavac Furovac 5 por vía oral

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

a las dosis recomendadas para los salmónidos también reduce los títulos de anticuerpos en el rodaballo (datos no mostrados). Otros investigadores han descrito una disminución de los niveles de anticuerpos específicos en carpas después de la alimentación prolongada con ferritina (Rombout y col, 1989) y después de la administración de una única dosis de ferritina seguida de la inyección intramuscular de la proteína diez semanas después (Joosten y col, 1997).

Por otra parte, los resultados del presente estudio indican que las vacunas a base de agua y las vacunas con adyuvante oleoso, administradas por inyección, conferían niveles de protección similares (RPS > 80%) transcurridos veintiún meses después de la inmunización.

La elevada tasa de supervivencia de este grupo de peces (RPS > 80%) en comparación con la de los peces vacunados por inyección y mantenidos después en condiciones de laboratorio durante 6 meses (RPS=50%) puede explicarse por el contacto de los peces con las bacterias vivas presentes en el entorno de la piscifactoría, que probablemente actuó como una dosis de refuerzo. En el presente estudio se observó un efecto similar en un grupo de 100 peces que fueron vacunados por inmersión (dos dosis) y luego trasladados a una granja con una alta incidencia de furunculosis (RPS > 83%). El efecto de la exposición continua a niveles bacterianos bajos en el mantenimiento de la inmunidad durante toda la vida de los peces también ha sido descrito por Larsen y Pedersen (1997).

En conclusión, las vacunas y los procedimientos de vacunación deben adaptarse a las especies de peces y a las condiciones específicas de cada lugar de producción. Los estudios posteriores deberían centrarse en el diseño de programas de vacunación específicos para el control de la furunculosis a lo largo de todo el ciclo de producción del rodaballo en la piscifactoría.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 7

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

7 VACUNACIÓN: EFECTO SOBRE EL HEMATOCRITO Y RESPUESTA INMUNITARIA

7.1.MATERIALES Y MÉTODOS

7.1.1. Producción de autovacunas y evaluación de su eficacia

En este estudio se han utilizado dos autovacunas, una con base acuosa y otra adyuvantada con aceite no mineral (Montanide™ ISA 763-A, Seppic, Paris, France). La metodología que se siguió para la elaboración de la vacuna de base acuosa es la que se describió en el apartado 6.1.2. La autovacuna acuosa (AVAC) se ajustó a una concentración final de $5x10^9$ céls/ml, utilizando TSB-1 con un 0,3% (v/v) de formaldehido como diluyente. Para preparar la autovacuna adyuvantada (AVOL), se mezcló la autovacuna inactivada de base acuosa con el adyuvante MontanideTM (ISA 763A VG) en una proporción de 25:75 para obtener una emulsión fluida estable con una concentración final de $5x10^9$ céls/ml. La esterilidad e inocuidad de ambas vacunas se determinó como se describió en el apartado 6.1.2.

Las vacunas se administraron mediante inyección de 0,1 ml en la cavidad intraperitoneal de rodaballos de 30 g según la metodología descrita en el apartado 6.1.3 de esta memoria. Como control se utilizaron peces inyectados con el mismo volumen de PBS o de adyuvante. El tratamiento aplicado, número de peces utilizados en los ensayos, así como el protocolo de muestreo se muestran en la Tabla 18.

La eficacia de las vacunas se determinó mediante infección experimental utilizando la cepa de *Aeromonas salmonicida* IAs 06.1,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

aislada de rodaballo, transcurridos 90 y 180 días desde la vacunación. Las mortalidades se registraron diariamente hasta que se alcanzó al menos el 60% de la mortalidad específica en el grupo de control. La especificidad de la mortalidad se confirmó sembrando muestras de órganos internos (riñón y bazo) de los peces muertos o moribundos en placas TSA-1 y la recuperación de las cepas inoculadas en cultivo puro.

El porcentaje de supervivencia se calculó al finalizar el ensayo RPS_{100}, utilizando la fórmula de Amend (1981) según se describió en el apartado 6.1.4 y al alcanzar el 60% de mortalidad en el grupo control (RPS_{60}). Para determinar la RPS_{60} se trazaron las curvas de mortalidad específica en función del tiempo transcurrido desde el desafío, tanto para el grupo vacunado como para el grupo control. El tiempo correspondiente al 60% de mortalidad específica en los controles se determinó por interpolación y la mortalidad de los peces vacunados (M) se determinó en el momento correspondiente al 60% de mortalidad en los controles, siguiendo las recomendaciones de la Farmacopea Europea (2002 a,b). La RPS se calculó mediante la siguiente expresión:

$$RPS = \left(1 - \frac{M}{60}\right) X\ 100$$

M= Mortalidad en peces vacunados cuando se alcanza el 60% de mortalidad en el grupo control.

7.1.2. Recolección de muestras

La toma de muestras de sangre y riñón se realizó según el protocolo de muestreo que se muestra en la Tabla 18. Antes de la vacunación, se tomaron muestras de sangre del lote de peces que se iba a utilizar en los ensayos. Tras la vacunación, se realizaron muestreos al azar a las 0 y 3h, 7, 14, 21, 45, 90 y 180 días de los peces control y vacunados por inyección frente a las autovacunas de base acuosa y oleosa frente a

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Aeromonas salmonicida. En cada muestreo, los peces se sacrificaron por sobredosis de anestésico, se pesaron y midieron y se extrajo la sangre para el análisis del hematocrito, el estudio de las actividades del sistema inmune humoral no específico y determinación del título de anticuerpos. Para el estudio de la actividad estallido respiratorio se tomó muestra del riñón anterior.

7.1.3. Análisis del hematocrito y de la respuesta inmune

En este estudio se han evaluado el hematocrito y algunos parámetros de la respuesta inmunitaria no específica (actividad lisozima, actividad bactericida del suero de rodaballo y la actividad estallido respiratorio de los granulocitos) y específica (título de anticuerpos en sangre). Las determinaciones se han realizado como se describió en los apartados 5.1.4. y 5.1.5 de esta memoria.

7.1.4. Análisis estadístico

Todos los experimentos se hicieron por triplicado para cada pez, utilizando cinco peces por grupo de ensayo y punto de muestreo. Los resultados se expresaron como la media ± el error estándar (ES) de los datos analizados. Los datos se compararon usando la prueba ANOVA de una vía ($p<0,05$) y se comprobaron las diferencias significativas ($P<005$) mediante la prueba de Bonferroni. Para analizar las diferencias en supervivencia entre peces vacunados y control tras el desafío, se utilizó la prueba de chi-cuadrado a un nivel de significación de $P < 0,05$.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 18. Tratamiento muestreos realizados durante el ensayo y dosis utilizadas en el reto infeccioso.

	Tratamiento de los peces			
Grupo de peces	Vacuna AVAC (0,1 ml)	Vacuna AVOL (0,1 ml)	PBS (0,1 ml)	Adyuvante (0,1 ml)
Nº de peces utilizados	128	128	136	128
Muestreos postvacunación	0 y 3 horas; 7, 21, 45, 90 y 180 días		0 y 3 horas; 7, 21, 45, 90 y 180 días	
Nº de peces muestreados	5 por grupo		5 por grupo	
Dosis reto infeccioso	Dosis alta= 10^7 cel/ml Dosis baja= 10^6 cel/ml			

7.2.RESULTADOS

7.2.1. Eficacia de las autovacunas anti- furunculosis

Los resultados de los ensayos de infección experimental para evaluar la eficacia de las autovacunas AVAC y AVOL frente a *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* se muestran en la Tabla 19. Los niveles de protección alcanzados frente a la furunculosis causada por esta especie fueron reducidos, siendo los valores de protección más altos (RPS_{60}=54% y RPS_{100}=50) cuando se realizaba la inmunización con la autovacuna AVOL, y se utilizaba una dosis baja (4,1x 10^6 cel/ml) en el reto infeccioso (Tabla 19). En los peces inmunizados con la vacuna oleosa se observaron adherencias de los órganos internos. En los retos infecciosos realizados a los 180 días post infección se observaron mortalidades inferiores al 60% en los grupos control y por

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

tanto las pruebas no se consideraron válidas para la determinación de los valores de RPS_{60}.

7.2.2. Efecto de la vacunación en el hematocrito

Los resultados del análisis de hematocrito de los peces vacunados frente a *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* y peces control no inmunizados se muestran en la Figura 39. El hematocrito de los peces control y vacunados mostró valores comprendidos entre 21,2% a 35,7% y entre 20,9% a 36,8%, respectivamente. No se detectaron diferencias significativas ($p<0,05$) en el valor hematocrito entre peces vacunados y control, aunque existe una influencia del tiempo postvacunación en la actividad de los sueros ($p < 0,05$).

Tabla 19. Eficacia de las autovacunas de base acuosa (AVAC) y base oleosa (AVOL) en la prevención de la furunculosis en rodaballo.

Tratamiento peces	Nº peces por dosis	Protección 90 días post vacunación			
		%Muertos	RPS60	%Muertos	RPS100
Vacunados AVAC	DA=20 DB=20	DA= 51,1 DB= 37,6	14,9 11,0	DA= 95,0 DB= 80,0	5 0
Vacunados AVOL	DA=20 DB=20	DA= 51,1 DB= 27,6	14,9 54,0	DA= 75,0 DB= 40,0	25,0 50,0
Control PBS	DA=20 DB=20	DA= 60,0 DB= 60,0		DA=100,0 DB=80,0	
Adyuvante	DA=20 DB=20	DA= 60,0 DB= 60,0		DA=80,0 DB=80,0	

RPS100, porcentaje relativo de supervivencia a los 21 días desde el inicio de las mortalidades, RPS60, RPS al alcanzar el 60% de mortalidad en el control.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

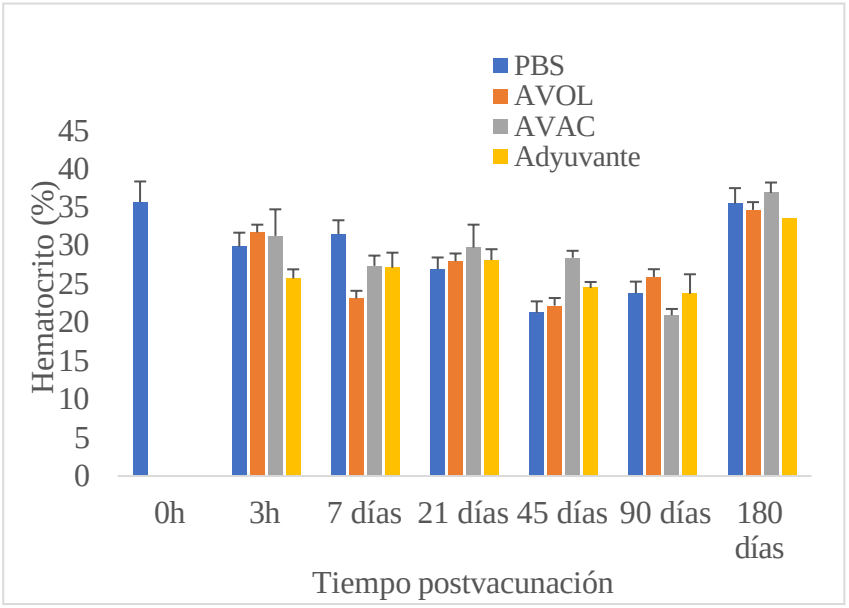


Figura 39. Valor hematocrito de los peces vacunados frente a Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida con las autovacunas acuosa (AVAC) y oleosa (AVOL).

7.2.3. Efecto de la vacunación en la respuesta inmune innata

7.2.3.1. Actividad lisozima

El análisis de la actividad lisozima de los sueros de peces vacunados frente a *A. salmonicida* (vacunas AVAC y AVOL) y los peces control se muestra en la Figura 40.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

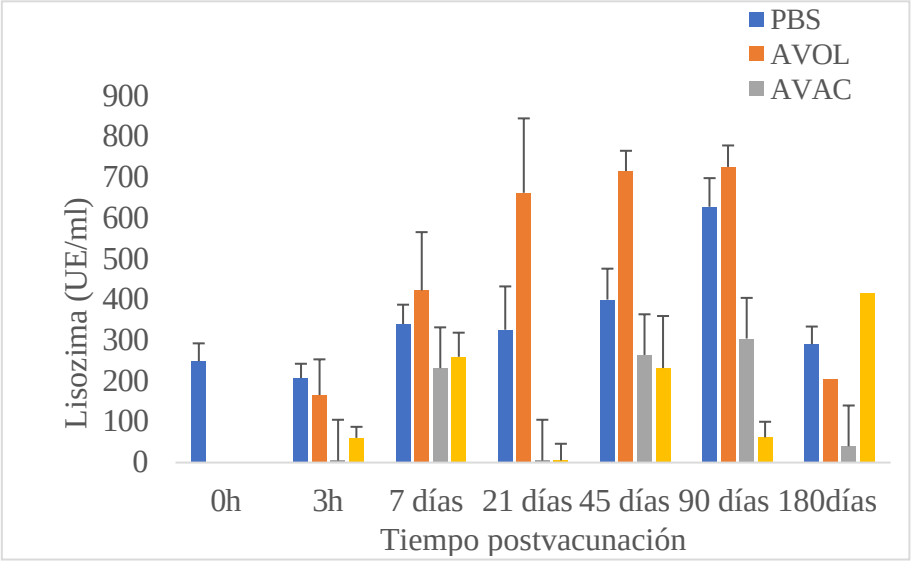


Figura 40. Actividad lisozima de los peces vacunados frente a Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida con las autovacunas acuosa (AVAC) y oleosa (AVOL).

La actividad lisozima del suero de los peces vacunados con la vacuna AVOL se incrementó con respecto a los valores observados en peces control a partir de los siete días postvacunación y retornó a valores similares a los observados en peces control a los 180 días después de la vacunación (Figura 40). En el caso de los peces inmunizados con la vacuna acuosa (AVAC) y en peces inyectados con el adyuvante la actividad lisozima del suero fue siempre inferior a la observada en los peces control, excepto a los 180 días postvacunación. Se observó una influencia del tipo de vacuna utilizada (AVOL o AVAC) en la actividad de los sueros ($p < 0,05$), siendo siempre los niveles de actividad lisozima del suero de los peces inmunizados con la vacuna AVOL superior a la observada en el suero de los peces inmunizados con la vacuna AVAC.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7.2.3.2. Actividad bactericida del suero

La actividad bactericida del suero de los peces inmunizados frente a *A. salmonicida* y de los peces control se muestra en la Figura 41. La actividad bactericida del suero de peces vacunados fue superior a la observada en los peces control a los 21, 45 y 180 días postvacunación. No se apreciaron diferencias significativas en la actividad bactericida del suero entre los peces control y los peces inmunizados a lo largo del estudio, independientemente del tipo de vacuna utilizada (acuosa o adyuvantada).

7.2.3.3. Estallido respiratorio de granulocitos

La actividad respiratoria de los peces vacunados frente a *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* (Figura 42) comenzó a aumentar a partir de las 3 horas postvacunación (excepto en peces inmunizados con la vacuna AVOL) y entre los días 7 a 45 post vacunación retornó a valores similares a los de los peces control. A lo largo del período analizado se detectaron diferencias significativas ($p<0,05$) en la actividad respiratoria de los granulocitos de peces vacunados y control y de peces inyectados con el adyuvante y control a las 3h, 7 y 90 días de administración del tratamiento. A partir de los 45 días después de la vacunación se observó un gran aumento de la actividad, llegando a valores de IE^3 80 en el caso de los peces inmunizados con la vacuna adyuvantada AVOL. Se observó una influencia del tiempo postvacunación ($p < 0,05$) pero no de la vacuna en la actividad de los leucocitos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

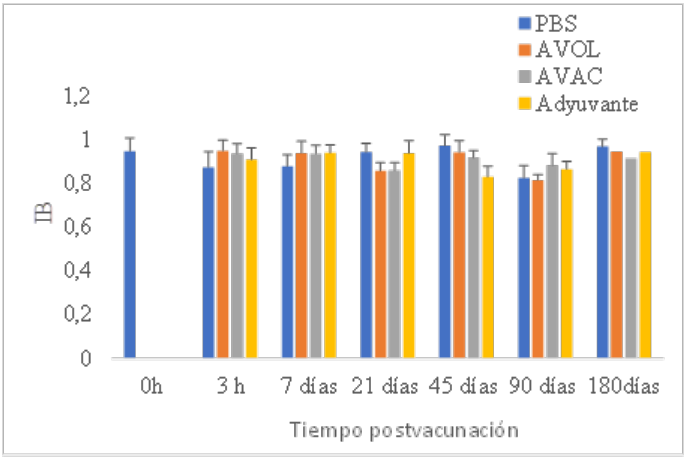


Figura 41. Actividad bactericida de los peces vacunados frente a Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida con las autovacunas acuosa (AVAC) y oleosa (AVOL).

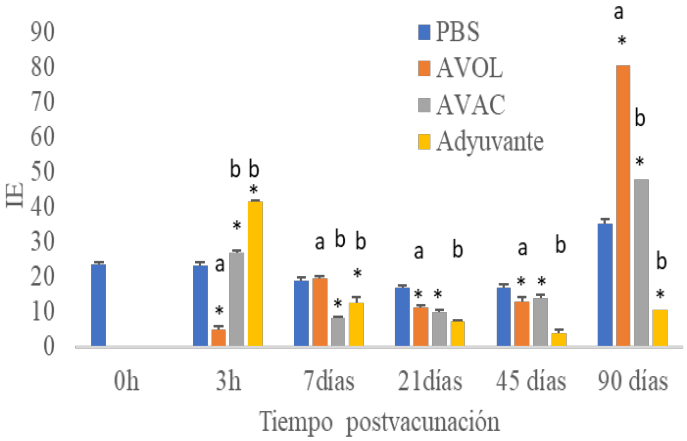


Figura 42. Actividad respiratoria de los granulocitos de los peces vacunados frente a Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida con las autovacunas acuosa (AVAC) y oleosa (AVOL). Las diferencias significativas (p<0,05) entre peces control y vacunados o inyectados con adyuvante en un momento determinado se indican con asterisco. La existencia de diferencias significativas entre grupos a lo largo del tiempo se indica con diferentes letras.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7.2.3.4. Respuesta inmune humoral específica

La Figura 43 muestra los resultados del análisis mediante el ensayo ELISA doble indirecto de los sueros de peces vacunados con las autovacunas AVAC y AVOL y control (PBS y adyuvante). Los niveles de anticuerpo en el suero de peces vacunados con AVAC y AVOL se incrementaron por encima de los valores observados en peces control a partir de los siete días postvacunación y se mantuvieron siempre más elevados que en los sueros de peces control durante todo el período analizado (180 días). Los niveles de anticuerpo en peces vacunados con la vacuna oleosa AVOL fueron siempre superiores a los observados en peces inmunizados con la vacuna de base acuosa AVAC, aunque no se observaron diferencias significativas en el nivel de anticuerpos en función de la vacuna utilizada.

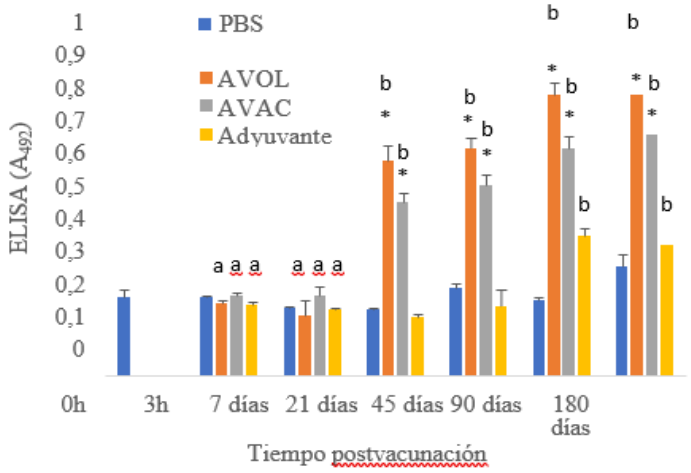


Figura 43. Niveles de anticuerpos (A492) en el suero de los peces vacunados frente a Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida con las autovacunas acuosa (AVAC) y oleosa (AVOL). Las diferencias significativas (p<0,05) entre peces control y vacunados o inyectados con adyuvante en un momento determinado se indican con asterisco. La existencia de diferencias significativas entre grupos a lo largo del tiempo se indica con diferentes letras.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7.3. DISCUSIÓN

La vacunación desempeña un papel importante en la piscicultura comercial a gran escala. Aunque se han aplicado diferentes métodos de vacunación para proteger a los peces de los efectos nocivos de diversos patógenos, la mayoría de las vacunas en acuicultura se aplican mediante inyección. Este método es el más laborioso, pero tiene la ventaja de que el volumen de vacuna necesario es relativamente bajo y garantiza que cada pez es vacunado con la dosis adecuada. Sin embargo, este método requiere que los peces hayan alcanzado un determinado tamaño, lo que dificulta la vacunación de los alevines. Las vacunas disponibles en el mercado suelen ser vacunas polivalentes con adyuvantes oleosos cuyo uso suele ir acompañado de efectos secundarios. Debido a ello, en los últimos años está aumentando el interés por el uso de autovacunas en acuicultura, así como por la búsqueda de adyuvantes con menores efectos secundarios (Schulz y col., 2020; Torres-Corral y col, 2020). En el presente estudio se ha evaluado la eficacia de dos autovacunas, AVAC (de base acuosa) y AVOL (de base oleosa) administradas por inyección, en la protección del rodaballo frente a la furunculosis. Además, se ha investigado el efecto de la vacunación sobre el hematocrito y diferentes parámetros del sistema inmune humoral y celular.

En los ensayos de infección experimental, los niveles de protección más elevados se obtuvieron con la autovacuna de base oleosa utilizando una dosis de infección baja (RPS_{100}=50%; RPS_{60}=54%), aunque en estos peces se observó adherencia de los órganos internos como efecto secundario de la vacunación. La presencia de adherencias a nivel de órganos internos y de la pared abdominal en las zonas cercanas al punto de inyección de vacunas con adyuvantes oleosos (aceites minerales y no minerales) han sido descritas también en peces salmónidos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(Midtlyng, 1996 a, b; Cipriano y Bullock, 2001) y rodaballo (Noia y col, 2014; Torres-Corral y col, 2020).

Aunque la significación del valor hematocrito como indicador del estado sanitario de los peces ha sido cuestionado (Houston, 1997), esta prueba es considerada como un método simple y no específico de valorar la salud de los peces y ha sido incluido como un índice informativo en los cultivos de peces salmónidos (Rehulka y col., 2004). El valor hematocrito ha sido también evaluado recientemente como posible marcador de la respuesta de los peces a la vacunación (Sukenda y col, 2018; Nadiro y col, 2020, Torres-Corral y col, 2020). En el análisis del hematocrito de rodaballo realizado en el presente trabajo, no se han encontrado diferencias significativas en los valores hematocritos en función del tipo de vacuna (AVAC y AVOL) anti-*A. salmonicida* usada ni entre peces vacunados y control. Se han descrito resultados similares en lucioperca vacunada frente a *A. salmonicida* (Schulz y col, 2020) y en rodaballo vacunado con vacunas bivalentes frente a *Vibrio anguillarum* y *A. salmonicida* spp. *achromogenes* (Torres. Corral y col, 2020).

El nivel y la actividad de la lisozima del suero se consideran un importante indicador de la inmunidad innata de los peces. La enzima lisozima, secretada por las glándulas submucosas, los neutrófilos y los macrófagos, tiene actividad antibacteriana y antiviral. Además, la lisozima promueve la fagocitosis de forma directa por activación de los leucocitos y macrófagos o indirectamente mediante opsonización.

Los ensayos de actividad lisozima realizados en el presente estudio muestran que la actividad del enzima en el suero de los peces vacunados con la vacuna oleosa AVOL se incrementa por encima de los valores observados en peces control a partir de la primera semana post vacunación, reduciéndose a valores similares a los de los peces control a los 180 días post vacunación. En contraste los peces vacunados con la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

vacuna acuosa AVAC o inyectados con el adyuvante mostraron siempre valores inferiores a los peces control inyectados con PBS. Estos resultados concuerdan con otros estudios en los cuales se refleja que algunas bacterinas o productos extracelulares bacterianos (ECPs) poseen capacidad de incrementar la actividad lisozima, como es el caso de *Aeromonas salmonicida* en trucha arcoiris (Ackerman y col., 2000) y lucioperca (Schulz y col, 2020) y *Mycobacterium* spp. en tilapia del Nilo (Chen y col., 1998), así como con otros inmunoestimulantes en rodaballo (Chen y col., 1998; Santarén y col., 1997; Villamil y col., 2003). También se ha demostrado que el aumento de lisozima provocado por la vacunación depende del tipo de antígeno y del adyuvante utilizado en la vacuna (Chen et al., 1998; Ackerman et al., 2000¸ Chin y Woo, 2005). En base a los resultados obtenidos en el presente estudio no se puede afirmar que la actividad lisozima desempeñe un papel directo en la protección de los peces. Sin embargo, el incremento de los niveles de la enzima puede reflejar cambios en la población de glóbulos blancos durante el desarrollo de la respuesta inmunitaria, una mayor actividad de los granulocitos y una activación general de la inmunidad como ha sido sugerido por otros investigadores (Koskela y col, 2004; Schulz y col, 2020).

Los niveles de actividad bactericida observados en los peces vacunados frente a *A. salmonicida* en nuestro estudio son similares a los descritos en rodaballo y otras especies de peces tratados con antígenos bacterianos o con protozoos ciliados (Ackerman y col., 2000; Sitjà-Bobadilla y col., 2003; 2008; Wang y col, 2020) y difieren, de los valores encontrados en peces sanos no inmunizados. No se encontraron diferencias significativas (ANOVA, $p < 0,05$) entre los peces control y los inmunizados frente a *A. salmonicida*, con independencia de la autovacuna utilizada.

El análisis de la actividad estallido respiratorio ha sido utilizado

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

para valorar la funcionalidad de los granulocitos y como un índice del estado de salud general de los peces (Anderson, 1994) y, de hecho, varios investigadores han demostrado la existencia de variaciones en la actividad respiratoria de los leucocitos después de la infección experimental de los peces con diferentes patógenos (Leiro y col., 2001; 2004; Villamil y col., 2003; Sitjà-Bobadilla y col., 2006). El estudio de esta actividad es también útil en la evaluación de la eficacia de las vacunas (Anderson, 1992; Chen y col., 1996, 1998; Chin y Woo, 2005; Wang y col, 2020), inmunostimulantes (Jeney y Anderson 1993; Logambal y col., 2000), y del efecto de la polución ambiental sobre el sistema inmune de los peces (Stasiak y Baumann 1996).

En el presente estudio se ha evaluado el efecto de la vacunación frente a *A. salmonicida* sobre la actividad respiratoria de los leucocitos de riñón anterior de rodaballo. Los resultados obtenidos demostraron que en peces vacunados por vía intracelómica frente a *A. salmonicida* se observa un incremento significativo de la actividad respiratoria de los leucocitos (GMFI > 80). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros investigadores utilizando vacunas vivas frente a *Cryptobia salmo* en salmón atlántico (Chin y Woo, 2005) y vacunas inactivas frente a *Streptococcus agalactiae* en tilapia (Wang y col, 2020) o tras la administración oral de *Bacillus subtilis* como probiótico en ciprínidos (*Labeo rohita*) y sugieren que la administración de vacunas de base acuosa o de base oleosa puede estimular alguna respuesta inmune innata en rodaballo. Con respecto a la respuesta inmune humoral específica se ha observado que los niveles de anticuerpos circulantes fueron siempre significativamente ($p<0,05$) mayores en el suero de peces vacunados que en el control, indicando que la respuesta inmune humoral específica juega un papel crucial en la protección del rodaballo frente a la furunculosis.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 8

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

8 DISCUSIÓN GENERAL

En las últimas décadas se ha multiplicado la demanda de pescado a nivel mundial que no puede ser cubierto por el aporte de pescado procedente de la pesca extractiva (Apromar, 2021). La acuicultura representa, por tanto, una alternativa para dar respuesta a la creciente demanda de productos acuáticos sanos y nutritivos y constituye uno de los sectores de producción animal con mayor desarrollo y potencial de crecimiento.

La intensificación de la industria acuícola y la diversificación de las especies en cultivo se ha visto acompañada de la aparición de enfermedades infecciosas (Santos, 2005; Toranzo y col., 2005), que causan cuantiosas pérdidas económicas para la industria. Las enfermedades infecciosas de etiología bacteriana son las principales responsables de problemas patológicos que afectan a las poblaciones de peces en cultivo (Santos, 2005; Toranzo y col., 2005). La furunculosis típica, causada por *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*, es una de las principales enfermedades bacterianas que afectan a peces cultivados en aguas marinas y continentales en todo el mundo. La enfermedad causa una alta mortalidad y morbilidad y la aparición de lesiones ulcerativas que alteran la apariencia del pescado y reducen su valor comercial, siendo un factor limitante en los cultivos de peces de alto valor económico como el salmón Atlántico, trucha arco iris, bacalao del Atlántico, rodaballo, dorada, lubina y lenguado senegalés. El desarrollo de métodos eficaces de prevención y control de la enfermedad requiere el conocimiento del agente causal y de sus mecanismos de patogenicidad. Por ello, el primer aspecto abordado en este trabajo fue la caracterización de cepas de *A. salmonicida* causantes de mortalidad en las granjas de cultivo de peces salmónidos y no salmónidos en

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

España y Portugal y el estudio de sus factores de virulencia.

Los resultados de la presente investigación han permitido confirmar que *A. salmonicida* subespecie *salmonicida* es la principal causa de furunculosis en la piscicultura ibérica. La bacteria constituye un grupo homogéneo a nivel bioquímico y serológico. Además, el análisis de los componentes de la envoltura celular de las cepas de *Aeromonas salmonicida* en estudio reveló una gran similitud en los patrones de proteínas y lipopolisacáridos, no detectándose diferencias en función del origen geográfico o la especie de pez a partir de la cual fueron aisladas las cepas. La homogeneidad detectada por métodos serológicos (ensayos de aglutinación en portaobjeto y "Dot blot") dentro de la especie *A. salmonicida* ssp *salmonicida*, concuerda con la similitud en los patrones de LPS y de proteínas de la envoltura celular, pudiendo hablarse de la existencia de un único grupo antigénico dentro de la especie. Esta gran homogeneidad coincide con la descrita para cepas de esta misma especie por otros investigadores (Aoki y Trust, 1984, Aoki y Holland, 1985; Kitao y col, 1985). En contraste, la aplicación de la técnica de RAPD combinada con el análisis de conglomerados de los perfiles genómicos obtenidos ha demostrado la existencia de variabilidad genotípica dentro de la especie *A. salmonicida* ssp *salmonicida*,, no asociada a la especie de pez/área geográfica de aislamiento de las cepas. Estos resultados difieren de los obtenidos por O'hIci y col. (2000) quienes observaron una clara relación entre los grupos genómicos y el área de aislamiento de *A. salmonicida*, sugiriendo que el análisis del polimorfismo genómico mediante RAPD era de utilidad para la tipificación epizootiológica de *A. salmonjcida* ssp. *salmonicida*.

La virulencia bacteriana viene determinada por un conjunto de factores que permiten a las bacterias patógenas superar los mecanismos de defensa del huésped y causar enfermedad (Reith y col., 2008; Beaz-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Hidalgo y Figueras, 2013; Dallaire-Dufresne y col, 2014). Aunque se han descrito una serie de potenciales factores de virulencia celulares y extracelulares en cepas de *A. salmonicida*, el mecanismo de patogenicidad de esta bacteria aún no ha sido esclarecido.

Uno de los factores de virulencia conocidos de *A. salmonicida* que juega un papel importante para la fijación y la entrada a las células del huésped son las adhesinas, la capa superficial y los pili (Austin y Austin, 2016; Reith et al., 2008). Sin embargo, sólo la capa A, que se asocia con los lipopolisacáridos (LPS) en la superficie celular, se ha descrito como un factor de virulencia importante de *A. salmonicida* (Austin y Austin, 2016; Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013). Las cepas que presentan capa A también tienen una alta proporción de aminoácidos hidrofóbicos; una propiedad que aumenta la hidrofobicidad de la superficie bacteriana, aumentando su capacidad para asociarse con los macrófagos, auto aglutinarse y adherirse al tejido del huésped. En el presente estudio, todas las cepas analizadas presentaron una proteína mayoritaria con una masa molecular de 49 Kda, similar a la descrita como componente de la capa A. Sin embargo, no todas las cepas mostraron capacidad auto aglutinante ni de adherencia, valorada en base a ensayos de hemaglutinación con eritrocitos humanos y de rodaballo. Otros factores de virulencia que se han señalado como importantes para la virulencia de *A. salmonicida* son los productos extracelulares (ECP). El análisis de los ECPs de las cepas de este estudio demostró la presencia de proteasas y citoxinas que podrían estar implicadas en el desarrollo de las lesiones detectadas en peces afectados de furunculosis como sugirieron otros investigadores (Ellis y col, 1981, Coscelli y col, 2014). En conclusión, el mecanismo de virulencia de *A. salmonicida* es un sistema complejo en el que parecen intervenir tanto factores celulares como extracelulares.

El desarrollo de vacunas eficaces y el conocimiento del estado

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

sanitario de los peces depende, en gran parte, del desarrollo de métodos estándar para el análisis del sistema inmunitario y su capacidad de respuesta frente a patógenos. Por ello, un segundo objetivo abordado en este estudio fue el desarrollo de herramientas que permitan valorar la respuesta inmunitaria humoral (específica y no específica) del rodaballo. Con este fin, la investigación se centró en la caracterización del componente C3 del complemento y la obtención de un antisuero para su detección y en la optimización de un inmunoensayo enzimático para la detección de anticuerpos específicos frente a *A. salmonicida* spp. *salmonicida* en el suero de rodaballo.

Los resultados del análisis del componente C3 del complemento de rodaballo han demostrado que está constituido por proteínas de dos cadenas (α y ß) glicosiladas y con un tamaño (110 y 80 kDa) similar al descrito para las cadenas C3 de mamíferos y peces. A diferencia de lo descrito para trucha, carpa y dorada (Sunyer y col, 1996, Sanyer y col, 1997; Nakao y col, 2000), no se ha detectado la existencia de isotipos en el componente C3 del rodaballo. El suero policlonal anti-C3 del rodaballo obtenido en este estudio es capaz de detectar las cadenas α y β y podría ser utilizado como herramienta para un mejor conocimiento del funcionamiento del sistema del complemento y de la respuesta inmunitaria asociada en rodaballo.

Por otra parte, se llevó a cabo la optimización de un ensayo inmunoenzimático (ELISA) doble indirecto para la detección de anticuerpos específicos frente a *A. salmonicida* spp. *salmonicida* en el suero de rodaballo, basado en el desarrollado por Estévez (1994).

Los resultados obtenidos demostraron que, en las condiciones de ensayo establecidas, el uso de antígeno frente a la célula bacteriana inactivada con formol (CBF) confiere una respuesta de anticuerpos superior a la que se obtiene utilizando como antígenos los extractos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

crudos bacterianos (ECB) o el antígeno “O”. Resultados similares han sido ya descritos por otros investigadores (Bogwald y col., 1991; Lund y col., 1991) empleando células bacterianas completas. Además, se adaptaron las condiciones de incubación y las diluciones de los anticuerpos para cada una de las fases del ELISA, de modo que el ensayo optimizado puede realizarse en aproximadamente 4 horas, reduciendo considerablemente el período para la obtención de resultados con respecto al ensayo original (17,5 h) descrito por Estévez (1994).

La identificación de los antígenos inmunogénicos para peces es un paso esencial en el desarrollo de vacunas. Por ello, otro aspecto abordado en el presente trabajo fue el análisis comparativo de los antígenos expresados por *A. salmonicida* durante el crecimiento de los microorganismos en condiciones “in vitro” (cultivo en medio TSA-1 y en las líneas celulares de peces CHSE-214 y SAF-1) e “in vivo” (durante la infección en rodaballo). Los resultados obtenidos parecen indicar que, *A. salmonicida* expresa antígenos similares cuando crece “in vivo” e “in vitro”. Una importante limitación del presente estudio es que el antisuero utilizado en los análisis fue obtenido frente a células cultivadas en condiciones de laboratorio que no reproducen las condiciones de crecimiento de la bacteria en el pez. Además, las bacterias se inactivaron con formaldehido y, por tanto, algunos epítopos pueden haber sido expresados en bajas proporciones o alterados por el tratamiento con el aldehído. Resultados similares han sido ya descritos por otros investigadores (Bogwald et al., 1991; Lund et al., 1991) empleando células bacterianas completas.

En conclusión, los resultados del presente estudio han permitido el desarrollo de herramientas que pueden ser de utilidad para el estudio de la respuesta inmunitaria del rodaballo frente a la infección y la vacunación, así como para la selección de antígenos de interés para la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

producción de vacunas frente a la furunculosis típica causada por *A. salmonicida* ssp. *salmonicida,* sin necesidad del uso de animales de experimentación.

El estudio de parámetros hematológicos e inmunológicos de los peces se ha incrementado notablemente en los últimos años con el fin de buscar marcadores útiles en la detección de estrés y/o enfermedad.

Con el fin de identificar marcadores del estado sanitario de los peces, en el presente estudio se ha valorado el efecto de la infección experimental de rodaballos con una cepa de la especie *A. salmonicida* sobre parámetros hematológicos (niveles de hemoglobina y hematocrito) e inmunológicos (actividad lisozima y bactericida del suero y estallido respiratorio de los granulocitos). Durante el período de tiempo analizado (96 h postinfección) no se observaron diferencias significativas ($p<0,05$) en el valor del hematocrito y niveles de hemoglobina entre peces infectados y peces control. En contraste, otros investigadores han descrito variaciones en el valor hematocrito en tilapias infectadas experimentalmente con *Enterococcus* (Martins y col, 2008), *Streptococcus spp* (McNulty y col, 2003; Chen y col, 2004; Alsaid y col., 2015), y en salmónidos infectados con *Piscirickettsia salmonis* (Isla y col, 2022), *Aeromonas salmonicida* (Foda, 2011) y *L. anguillarum* (Lamas y col, 1994). Las diferencias descritas pueden deberse a la diferente respuesta de los peces a los patógenos o a sus antígenos o a diferencias en las condiciones de experimentación y/o ambientales durante período post infección evaluado. Tampoco se observaron en el presente estudio diferencias en el hematocrito entre peces control y peces inmunizados con autovacunas de base acuosa (AVAC) o de base oleosa (AVOL). Estos resultados son similares a los descritos en luciopercas inmunizadas por diferentes vías frenta a *A. salmonicida* (Schulz y col, 2020).

Al igual que otros animales vertebrados, los peces tienen una serie

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de mecanismos humorales y celulares específicos y no específicos que actúan de forma complementaria con el fin de proteger al organismo de agentes patógenos (Dalmo y col., 1997; Ellis, 1999; Scapigliati y col., 1999; Dixon y Stet, 2001; Watts y col., 2001; Tort y col., 2003; Magnadóttir, 2006; Godoy, 2010; Gómez y col, 2013; Rauta y col, 2012; Secombes y Wang, 2012).

En el presente estudio se han evaluado algunos parámetros de la respuesta inmune humoral innata en peces control sanos y en peces infectados experimentalmente con *A. salmonicida* o inmunizados frente a la furunculosis típica con el fin de establecer métodos rápidos, fiables y no cruentos para evaluar el estado sanitario de los peces.

Los resultados del estudio demostraron que el suero de los peces infectados con *A. salmonicida* o vacunados frente a la furunculosis muestra niveles de actividades lisozima y bactericida superiores al observado en el suero de peces control durante las primeras horas post infección o vacunación, reduciéndose posteriormente la actividad a valores similares o inferiores a los observados en peces control. Estos resultados concuerdan con los descritos en rodaballo y otras especies de peces infectados con *Aeromonas* spp., *Vibrio pelagius, Edwardsiella tarda* o *Mycobacterium* spp (Siwicki y Studnicka, 1987; Moyner y col, 1993, Villamil y col, 2003; Kim y col, 2020, Schulz y col, 2020) o tratados con antígenos bacterianos y de protozoos ciliados (Ackerman y col., 2000; Sitjà-Bobadilla y col., 2003; 2008), productos extracelulares bacterianos e inmunoestimulantes (Santarén, 1997).

En cuanto a la respuesta celular innata, se ha observado que la actividad respiratoria de los granulocitos de rodaballos infectados experimentalmente con *A. salmonicida* spp *salmonicida* aumentaba por encima de los valores observados en peces control transcurridas 48h post infección, retornando a valores inferiores a los de los peces control a las 96h post infección. Este hecho, unido a la recuperación de la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

bacteria a partir de los tejidos de peces infectados transcurridas 96h post infección sugiere que *A. salmonicida* es capaz de controlar la respuesta inmune celular para evitar su eliminación durante la infección temprana. La capacidad de internalización de las cepas de *A. salmonicida* y su potencial supervivencia en los macrófagos de los peces y en otras células, ha sido descrita previamente (Daly et al., 1996; Fast et al., 2009; Garduño y Kay, 1992; 1995; Garduño et al., 2000) y se ha sugerido que A. *salmonicida* puede utilizar los fagocitos como mecanismo de evasión de la respuesta inmunitaria.

La producción de anticuerpos, junto con las respuestas inmunitarias mediadas por células, constituyen el sello distintivo de la inmunidad protectora en los peces vacunados. En el presente estudio se ha observado que la inmunización con la vacuna oleosa AVOL confiere mayor grado de protección al rodaballo que la vacuna de base acuosa AVAC. Sin embargo, en los peces vacunados con AVOL se observaron efectos secundarios en los peces como la adherencia de los órganos internos. En los peces vacunados se observó un incremento de la actividad respiratoria de los granulocitos y de los niveles de anticuerpos específicos. Este incremento fue siempre mayor en los peces inmunizados con la autovacuna de base oleosa.

En conclusión, la respuesta inmune humoral específica y la respuesta inmune innata mediada por granulocitos juegan un papel crucial en la protección del rodaballo frente a la furunculosis. Los estudios futuros deberían centrarse en las autovacunas y en la evaluación de otros adyuvantes que mejoren la protección con efectos secundarios reducidos o nulos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 9

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

9 CONCLUSIONES

1) Las cepas de *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* en estudio presentaron homogeneidad en los caracteres fisiológicos y a nivel antigénico y cierto grado de heterogeneidad a nivel genético, fueron virulentas para peces y sus productos extracelulares resultaron tóxicos para peces y líneas celulares. De las técnicas de tipificación evaluadas sólo el análisis RAPD resultó de utilidad para la caracterización genética de *A. salmonicida.*

2) Se han optimizado técnicas serológicas para la detección de anticuerpos específicos y para la identificación *in vitro* de antígenos de *A. salmonicida* inmunogénicos para peces y se caracterizó y se obtuvo un anticuerpo específico frente al componente C3 del complemento de rodaballo que podrá ser utilizado como herramienta para el estudio del funcionamiento del sistema inmune de rodaballo, de su sistema de complemento y de la respuesta inmune asociada.

3) La infección experimental de rodaballos con *A. salmonicida* incrementa las actividades lisozima y estallido respiratorio de los granulocitos renales. El análisis de la actividad lisozima del suero es un método útil y no destructivo para evaluar el estado sanitario de los peces.

4) La autovacuna y la vacuna Aquavac Furova 5 de base acuosa y la vacuna Alpha Ject 1200 de base oleosa administradas por inyección en una única dosis inducen niveles de protección similares, pero de corta duración (sólo seis meses). La administración de una dosis de recuerdo

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

mediante inyección no mejora los niveles de protección y la revacunación por vía oral induce tolerancia. Se ha encontrado correlación entre el título de anticuerpos y el grado de protección.

5) La autovacuna con adyuvante oleoso induce niveles de protección más elevados que la autovacuna de base acuosa y producen una mayor estimulación de la producción de anticuerpos específicos, de la actividad lisozima del suero y de la actividad estallido respiratorio de los granulocitos renales.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CAPÍTULO 10

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

10 BIBLIOGRAFÍA

Ackerman, P.A.; Iwama, G.K; Thornton, J.C.; (2000) Physiological and immunological effects of adjuvanted *Aeromonas salmonicida* vaccines on juvenile rainbow trout. J Aquat Anim Health; 12,157-164.
DOI: 10.1577/15488667(200006)012<0157:PAIEOA>2.0.CO;2

Adams, A., Bundy, A. Thompson, K. T.Horne, M. 1988. The association between virulence and cell surface characteristics of *Aeromonas salmonicida.* Aquaculture. 69 (1–2), 1-14. DOI: 10.1016/0044-8486(88)90181-0.

Alsaid, M., Abuseliana, A.F., Daud, H.Hj. M., Noordin, M.M. 2015 Haematological, biochemical, and clinical signs changes following experimental infection of *Streptococcus agalactiae* in red hybrid tilapia (Oreochromis sp.). Aquacultura Indon. 4(9), 289-295. DOI:10.21534/ai.v15i2.36

Anderson, R.S., 1994. Modulation of blood cell-mediated oxyradical production in aquatic species: amplications and applications. En: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.), Aquatic Toxixology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives. CRC Press, USA, pp. 241 – 265

Amend, D.F. 1981. Potency testing of fish vaccines. En: Anderson, D.P. y Hennessen, W. Editores, Fish biologics: serodiagnostics and vaccines. S. Karger, Basel, Switzerland. pp. 447-454

Aoki,T., Trust, T. J, 1984. Electrophoretic analysis of the lipopolysaccharide from *Aeromonas salmonicida* strain isolated in Japan. Bull. Japan. Scienti. Fish. 50, 1789.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Aoki, T., Holland, B.I., 1985. The outer membrane proteins of the fish pathogens *Aeromonas hydrophila, Aeromonas salmonicida* and *Edwardsiella tarda* . *FEMS Microbiology Letters*, Volume 27 (3), 299–305, DOI:10.1111/j.1574-6968.1985.tb00686.x

APROMAR OPP30. Informe 2021. La acuicultura en España. Asociación Empresarial de Acuicultura de España. https://apromar.es/informes/

Austin D. A., McIntosh D., Austin B. (1989) Taxonomy of fish associated *Aeromonas spp*., with the description of *Aeromonas salmonicida subsp. smithia subsp. nov*. Syst Appl Microbiol 11, 277-290 DOI: 10.1016/S0723-2020(89)80026-8

Austin, B., Austin, D.A., 2016. Bacterial Fish Pathogens, Sixth Edit. ed. Springer, Chichester, UK. DOI: 10.1007/978-3-319-32674-0

Barry, T., Powell, R. & Gannon, F. A. 1990. General Method to Generate DNA Probes for Microorganisms. Nat Biotechnol 8, 233–236. DIO: 10.1038/nbt0390-233.

Beaz-Hidalgo and Figueras, M. J. 2013. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. J. Fish Dis 36 (4), 371-388. DOI: doi: 10.1111/jfd.12025

Beaz-Hidalgo, R., Martinez-Murcia, A., Figueras, M. J.. 2013. Reclassification of *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* Huys et al. 2002 and *Aeromonas aquariorum* Martinez-Murcia et al. 2008 as *Aeromonas dhakensis sp*. nov. comb nov. and emendation of the species *Aeromonas hydrophila*. Syst. Appl. Microbiol. 36, 171–176. DOI: 10.1016/j.syapm.2012.12.007

Beaz-Hidalgo, R., López-Romalde, S., Toranzo, A.E., Romalde, J.L., 2008. Polymerase chain reaction amplification of repetitive

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

intergenic consensus and repetitive extragenic palindromic sequences for molecular typing of *Pseudomonas anguilliseptica* and *Aeromonas salmonicida*. J. Aquat. Anim. Health 20, 75–85. Doi:10.1577/H07-007.1

Bogwald J, Dalmo RA (2019) Review on immersion vaccines for fish: an update 2019. Microorganisms 7(12):627. DOI: 10. 3390/microorgaisms7 120627

Bogwald, J., Stensvag, K., Hoffman, J., Jorgensen, T. 1991. Antibody specificities in Atlantic salmon *Salmo salar* L., against the fish pathogens *Vibrio salmonicida* and *Vibrio anguillarum*. J. Fish Dis., 14 (1),79-87. DOI: 10.1111/j.1365-2761.1991.tb00578.x

Bogwald, J., Stensvag, K., Espelid, S.1990. Electrophoretic and immunological analysis of surface antigens of the fish pathogens *Vibrio salmonicida* and *Vibrio anguillarum*. J. Fish Dis 13(4), 293-301. DOI: 10.1111/j.1365-2761.1990.tb00785.x

Boshra, H., Li, J., Sunyer, J., 2006. Recent advances on the complement system of teleost fish. Fish and Shellfish Immunology. 20, 239-262. DOI : 10.1016/j.fsi.2005.04.004

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

Buller, N., 2014. Bacteria and Fungi from fish and other aquatic animals, 2nd Edition. ed, CABI Publishing. ISBN 978-0851997384

Burr, S. E, Pugovkin.D, Wahli. T, Segner H, Frey. J. 2005. Attenuated virulence of an *Aeromonas salmonicida* subsp *salmonicida* type III secretion mutant in a rainbow trout model. Microbiology 151, 2111-2118. DOI: 10.1099/mic.0.27926-0

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999

Bruno, D. W. 2015. Furunculosis. Revised edition. ICES Identification Leaflets for Diseases and Parasites of Fish and Shellfish. Leaflet No. 37. 5 pp.7

Bricknell IR, Bowden TJ., Bruno, D.W, MacLachlan, P, Johnstone, R., Ellis AE. 1999 Susceptibility of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.) to infection with typical and atypical *Aeromonas salmonicida.* Aquaculture 175 (1-2),1-13

Campbell, C̄. M., Duncan, D., Price, N.C., Stevens, L., 1990.The secretion of amylase, phospholipase and protease from *Aeromonas salmonicida*, and the correlation with membrane-associated ribosomes. J. Microbiol. 13(6), 463-474. DOI: 10.1111/j.1365-2761.1990.tb00805.

Chart ,H., Trust,T.J, 1983.Acquisition of iron by *Aeromonas salmonicida*.. J. Bacteriol, 156 (2), 758-764. DOI: 10.1128/jb.156.2.758-764.1983

Chen S.C., Yoshida T., Adams A., Thompson K.D. & RichardsR.H. 1996. Immune response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, to extracellular products of *Mycobacterium* spp. Journal of Aquatic Animal Health8,216-222. DOI: 10.1577/1548-8667(1996)008<0216:IRORTT>2.3.CO;2

Chen, S-C, Yoshida, T, Adams, A, Thompson, K D and Richards, R H.1998. Non-specific immune response of Nile tilapia, *Oreochromis nilotica*,to the extracellular products of *Mycobacterium* spp. and to various adjuvants. J. Fish Dis 21, 39-46. DOI: 10.1046/j.1365-2761.1998.00075.x

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Chin A, Woo PT. 2005. Innate cell-mediated immune response and peripheral leukocyte populations in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., to a live *Cryptobia salmositica* vaccine. Parasitol. Res. 95(5), 299-304. DOI: 10.1007/s00436-004-1270-x PMID: 15682340

Cipriano, R.C., 1982. Immunogenic Potential of Growth Products Extracted from Cultures of *Aeromonas salmonicida* for Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*) .Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences Volume 39, Number 11 .Doi:10.1139/f82-203.

Cipriano RC, Austin B (2011) Furunculosis and other aeromonad diseases. In: Woo PT, Bruno DW (eds) Fish diseases and disorders, Vol 3. Viral, bacterial, and fungal infections, 2nd edn. CABI, Wallingford, p 424−483

Cipriano,R.C., Bullock,G.L. 2001. Furunculosis and other diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, Fish Disease Leaflet 66, 2001.

Cipriano, R. C. y Blanch, A. R., 1989. Different structural characteristics in the cell envelope of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. Microbios Letters . 40 (158), 87-95.

Collado, R., Fouz, B., Sanjuan, E., Amaro, C. 2000. Effectiveness of different vaccine formulations against vibriosis caused by *Vibrio vulnificus* serovar E (biotype 2) in European eels *Anguilla anguilla*. Dis Aquat Org.43(2), 91-101. DOI:10.3354/dao043091

Colwell, R. R.M T Macdonell, J De ley, Proposal to Recognize the Family *Aeromonadaceae* fam. 1986 . Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 36 (3), p. 473-477. DOI: 10.1099/00207713-36-3-473.

Coscelli, G., Bermúdez, R., Losada, A., Failde L.D. 2014. Acute *Aeromonas salmonicida* infection in turbot (*Scophthalmus maximus*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

L.). Histopathological and immunohistochemical studies. Aquaculture 430: 79-85. DOI:10.1016/j.aquaculture.2014.04.002

Chart, H., Trust, T. J. 1984. Characterization of the surface antigens of the marine fish pathogens *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. Can. J. Microbiol. 30, 703-710. 10.1139/m84-105

Chen CY, Wooster GA, Bowser PR. 2004. Comparative blood chemistry and histopathology of tilapia infected with *Vibrio vulnificus* or *Streptococcus iniae* or exposed to carbon tetrachloride, gentamicin of copper sulfate. *Aquaculture* 239, 421–443. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2004.05.033

Dacanay, A. Knickle, L. Solanky, K. S. Boyd, J. A. Walter, J. M.Brown, L. L. Johnson, S. C. Reith, M.2006 Contribution of the type III secretion system (TTSS) to virulence of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* Microbioliogy 152(6), 1847–1856..DOI: 10.1099/mic.0.28768-0.

Dahle , H, K; 1971.The purification and some properties of two aeromonas proteasses. Acta pathol microbiol scand. section B 79,726-738.

Dalmo, R.A., Ingebrigtsen, K. y Bøgwald, J. 1997. Non-specific defence mechanisms in fish, with reference to the reticuloendothelial system (RES). J Fish Dis, 20(4), 241-273. DOI: 10.1046/j.1365-2761.1997.00302.x

Dallaire-Dufresne,S.H.,Tanaka, M. K.,Trudel, V., Lafaille, A. J.,Charette S .J .*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis, Vet Microbiol 169 (1-2), 1-7. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.06.025.

Davidson G.A., Ellis A.E. & Secombes C.J. 1994. A preliminary investigation into the phenomenon of oral tolerance in rainbow trout

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792). *Fish Shellfish Immunol.* 4, 141–151. DOI: 10.1006/fsim.1994.1012

Dixon, B. y Stet, R.J.M. 2001. The relationship between major histocompatibility receptors and innate immunity in teleost fish. Develop Comp Immunol, 25(8-9), 683-699. DOI: 10.1016/s0145-305x(01)00030-1

Donlon, J., McGettigan, S., O'Brien, P., Carra, P. Ó, 1983. Re-appraisal of the nature of the pigment produced by *Aeromonas salmonicida* . *FEMS Microbiol Lett*, 19 (2-3), 285–290, DOI:10.1111/j.1574-6968.1983.tb00558.x

Durbin M., McIntosh D., Smith P.D., Rwardle R. & Austin B.1999. Immunization against furunculosis in rainbow trout with iron-regulated outer membrane protein vaccines: relative efficacy of immersion, oral, and injection delivery. *J. Aquat Ani. Health* 11, 68–75. DOI: 10.1577/1548-8667(1999)011<0068:IAFIRT>2.0.CO;2

Ellis, A. E., 1997. The Extracellular Toxins of *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida. En* Furunculosis Multidisciplinary Fish Disease Research 1997, páginas 248-268. Eva-Maria Bernoth, Anthony E. Ellis, and Peter Smith (Eds), Academic Press. DOI:10.1016/B978-012093040-1/50013-0

Ellis, A.E. 1999. Immunity to bacteria in fish. *Fish Shellfish Immunol* 9(4)¸291-308. DOI: 10.1006/fsim.1998.0192

Ellis, A.E., Hastings, T.S., Munro, S.LA. 1981. The role of extracellular products of *Aeromonas salmonicida* in the pathology of furunculosis J. Fish Dis 4(1), 41-51. DOI :10.1111/j.1365-2761.1981.tb01108.x

Ellis, A.E., Burrows, A.S., Hastings, T.S, Stapleton. K.J., 1988

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Identification of *Aeromonas salmonicida* extracellular protease as a protective antigen against furunculosis by passive immunization. Aquacultures 70 (3), 207-218. DOI : 10.1016/0044-8486(88)90097-X

Estévez, J. 1994. La respuesta inmunitaria humoral del rodaballo. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago.

European Pharmacopoeia Commission Monograph (EPCM). 2002a. Furunculosis Vaccine (Inactivated, Oil-Adjuvanted, Injectable) For Salmonids. Vaccinum Furunculosidis ad Salmonideos Inactivatum cum Adiuvatione Oleosa Ad Injectionem, 01/2002:1521.

European Pharmacopoeia Commission Monograph (EPCM). 2002b. Vibriosis (Cold-Water) Vaccine (Inactivated) For Salmonids. Vaccinum Vibriosidis Aquae Frigidae Inactivatum ad Salmonideos, 01/2002:1580.

Evelyn, T P. T. 1984. Immunization against pathogenic vibnos. In: de Kinkelin, P., Michel, C. (eds.) Symposium on fish vaccination. Off. Intl. des Epizoot., Paris, p. 121-150.

Evensen, Ø. 2009. Development in fish vaccinology with focus on delivery methodologies, adjuvants, and formulations. En: Rogers C, Basurco B (eds). The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture. CIHEAM Opt Méditerranéennes 86, 177-186.

Faílde LD; Losada AP; Bermúdez R; Santos Y; Quiroga MI. 2014.Evaluation of immune response in turbot (*Psetta maxim*a L.) tenacibaculosis: Haematological and immunohistochemical studies. Microb Pathogen 76, 1-9. DOI: 10.1016/j.micpath.2014.08.008

Fast, M.D, Tse. B, Boyd J.M, Johnson, S.C. 2009. Mutations in the

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Aeromonas salmonicida subsp salmonicida type III secretion system affect Atlantic salmon leucocyte activation and downstream immune responses. Fish Shellfish Immun 2009, 27 (6), 721–728. DOI: 10.1016/j.fsi.2009.09.009.

Fazio, F., 2019. Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: A review Aquaculture 500(1), 237-242.

Fernández Álvarez C. 2019. Molecular diagnostic and biological methods: an alternative in the prevention and control of bacterial fish diseases. Tesis Doctoral. Universidad de Sntiago de Compostela.

Fernández-Álvarez, C, Gijón, D.M., Santos Y. 2016 a. First isolation of *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* from diseased sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), cultured in Spain. Aquaculture reports 4, 36–41. DOI: 10.1016/j.aqrep.2016.05.006

Fernández-Álvarez, C., González, F.S., Santos, Y. 2016b. Development of a SYBR green I real-time PCR assay for specific identification of the fish *pathogen Aeromonas salmonicida subspecies salmonicida,* Appl. Microbiol. Biotechnol. 100, 10585–10595. DOI: 10.1007/s00253-016-7929-2

Fernández-Álvarez,C., Torres-Corral,Y., Santos,Y., 2018. Use of ribosomal proteins as biomarkers for identification of *Flavobacterium psychrophilum* by MALDI-TOF mass spectrometry. J. Proteomics 170, 59–69. Doi:10.1016/j.jprot.2017.09.007.

Foda, A. 2011. Changes in Hematocrit and Hemoglobin in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) as a Result of Furunculosis Disease. J. Fish Res Board Can 30(3), 467-468. DOI:10.1139/f73-081

Fuller; D; W.Pilcher,K,S.& Fruer, J, L. 1977. A leucocyttolytic factor isolated from cultures of *Aeromonas salmonicida* . J. Fishries Res. WildLife Dis 24, 364-365. DOI: 10.1139/f77-16

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Garrote , A., Bonet , R., Merino , S., Simon-Pujol ,M.D., Congregado, F., 1992. Occurrence of a capsule in *Aeromonas salmonicida*. *FEMS Microbiol Letters* , 95 (2-3), 127-131, DIO: 10.1111/j.1574-6968.1992.tb05354.x

Garduño , R.A., Thornton , J.C ., Kay,W.W., 1993, *Aeromonas salmonicida* cultured in vivo. Infect Immun 61 (9), 3854-3862 DOI: 10.1128/iai.61.9.3854-3862.1993

Garduño, R, A, and Kay , W, W 1995; Capsulated cells of *Aeromonas salmonicida* grow in vitro have different functional properties than capsulated cells grow in vivo. Can. J. Microbiol 41; 941-945. DOI: 10.1139/m95-130

Godoy,M., Gherardelli,V., Heisinger,U., Fernandez,J., Olmos,P., Ovale, L., Ilardi,P., Avendaño-Herrera, R., 2010. First description of atypical furunculosis in freshwater-farmed Atlantic salmon, *Salmo salar L.*, J. Fish Dis 33, 441–449. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2010.01142.x.

Gómez D., Sunyer, J.O., Salinas, I. 2013. The mucosal immune system of fish: The evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. Fish & Shellfish Immunology 35(6), 1729-1739. DOI: 10.1016/j.fsi.2013.09.032

González S.F.; Santos Y. 2009.Serological methods for the detection of pathogenic bacteria in aquaculture: present status and prospects. En: Thangadurai, Devarajan, Hall, Steven G., Manimekalan, Arunachalam, Mocz, Gobar (Editors). Fisheries, aquaculture, and biotechnology.pp. 131 - 148. Agrobios (India).

Gravningen K, Thorarinsson R., Johansen L. H., Nissen B., Rikardsen K. S., Greger E. and Vigneulle M. 1998. Bivalent vaccines for sea bass (*Dicentrachus labrax*) against vibriosis and pasteurellosis

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

J. Appl. Ichthyol. 14, 359-162

Griffin ,P.J., Snieszko, S.F., Frigo, S.B.,.1953. Pigment formation by *Bacterium salmonicida*. J. Bacteriol. 65, 652-659. DOI: 10.1128/jb.65.6.652-659.1953

Gudding, R., Lillehaug, A., Evensen, Ø., 1999. Recent developments in fish vaccinology. Vet Immunol Immunopathol., 72(1-2), p. 203-212. DOI : 10.1016/s0165-2427(99)00133-6

Hänninen,M.L., Ridell,J., Hirvelä-Koski,V., 1995. Phenotypic and molecular characteristics of *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida* isolated from southern and northern Finland. J. Appl. Bacteriol 79 (1), 12-21.DOI:10.1111/j.1365-2672.1995.tb03118.x

Hastings T. S. & Ellis A. E. 1988 The humoral immune response of rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson, and rabbits to *Aeromonas salmonicida* extracellular products. J. Fish Dis 11, 147—160. 10.1111/j.1365-2761.1988.tb00534.x

Hermannsdottir R., Johannsdottir J., Smaradottir H., Sigurgisladottir S., Gudmundsdottir B.K., Bjornsdottir R. 2009. Analysis of effects induced by a pollock protein hydrolysate on early development, innate immunity and the bacterial community structure of first feeding of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae. Fish. Shellfish Immunol. 27, 595-602. DOI: 10.1016/j.fsi.2009.05.007

Hitchcock, P. J., and T. M. Brown. 1983. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. J. Bacteriol. 154:269–272. DOI : DOI: 10.1128/jb.154.1.269-277.1983

Hirst,I.D., Hastings,T.S., Ellis,A.E., 1991.Siderophore production by *Aeromonas salmonicida* J Gen Microbiol, 137 (5), 1185-1192

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

DOI:10.1099/00221287-137-5-1185.

Hirono,I., Aoki,T., 1993. Cloning and characterization of three hemolysin genes from *Aeromonas salmonicida.* Microbial Pathog 15 (4). 269-282. Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A.; Staley, J.T.,

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A.; Staley, J.T., Williams, S.T. 1994. Bergey´s Manual of Determinative Bacteriology, 9º ed Williams and Wilkins.

Houston, A.H. and Rupert, R. (1997). Immediate response of hemoglobin system of gold fish(*Cyprinus auratus*) to temperature change. Can. J. of Zoology. Vol. 54, 1731-1734.

Ishiguro , E.E., Kay ,W.W., Ainsworth ,T.J., Chamberlain , B ., Austen , R.A., Buckley, J.T, Trust,T.J, 1981. Loss of virulence when growing *Aeromonas salmonicida* at high temperatures. Journal of Bacteriolgy,p.333-340. Vol.148,Non. DOI : 10.1128/jb.148.1.333-340.1981.

Isla, A., Sánchez, P., Ruiz, P, Albornoz, R, Pontigo J.P., Rauch, M.C., Hawes, C., Vargas-Chacoff, L., Yáñez, A.J. 2022. Effect of low-dose *Piscirickettsia salmonis* infectionon haematological-biochemical blood parameters in Atlantic salmon (*Salmo salar*). J Fish Biol.2022;1–12

Jeney, G., Anderson, D.P., 1993. Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the the non-specificdefense mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus* mykiss). Aquaculture 116, 315-329. DOI : 10.1016/0044-8486(93)90416-V

Joosten P.H., Engelsma M.Y., van der Zee M.D. & Rombout J.H. 1997. Induction of oral tolerance in carp (*Cyprinus carpio*, L.) after feeding protein antigens. *Vet. Immunol. Immunopathol* 60, 187–196.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

DOI: 10.1016/s0165-2427(97)00124-4

Kado C. I., Liu, T.1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J Bacteriol145(3), 1365-1373. DOI: 10.1128/jb.145.3.1365-1373.1981.

Karczewski, J. M., G. J. E. Sharp, and C. J. Secombes. 1991. Susceptibility of strains of *Aeromonas salmonicida* to killing by cell-free generated superoxide anion. J. Fish Dis. 14, 367-373. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1991.tb00834.x

Kay, W.W., Bukley, J.T., Ishiguro, E.E., Phipps, B.M., Plmonette, J., Trust. T.J., 1981. Purification and Disposition of a Protein Surface Associated with *Aeromonas* Virulence *salmonicida* J. Bacteriolgy, 147(3), 1077-1084. DOI : 10.1128/jb.147.3.1077-1084.1981.

Keler, T., and A. Novotny. 1986. A metachromatic assay for the quantitative determination of bacterial endotoxin. Anal. Biochem. 156:189–193. DOI : 10.1016/0003-2697(86)90172-7

Kim, S., Jin J-S, Le, Da-W, Kim, J. 2020. Antibacterial activities of and biofilm removal by Ablysin, an endogenous lysozyme-like protein originated from *Acinetobacter baumannii* 1656-2. J Glob Antimicrob Resist 23, 297-302. DOI: 10.1016/j.jgar.2020.09.017.

Kitao T, Yoshida T, Aoki T, and Fukudome M. Characterization of an Atypical *Aeromonas salmonicida* Strain causing Epizootic Ulcer Disease in Cultured Eel Fish Pathology 20 (2/3), 107-114

Klontz , G, W.Yasutake , W, T.& Ross, A, J . 1966. Bacterial diseases of the *Salmonidae* in the western united states: pathogenesis of furunculosis in rainbow trout. American J. Vet reseach 27, 1455-1460

Koskela, J.; Rahkonen, R.; Pasternack, M.; Knuutinen, H. 2004. Effect of immunization with two commercial vaccines on feed intake,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

growth, and lysozyme activity in European whitefish (*Coregonus lavaretus* L.). Aquaculture 234, 41–50.DOI : 10.1016/j.aquaculture.2003.11.036

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685. DOI: 10.1038/227680a0

Lamas, J., Santos, Y., Bruno, D., Toranzo, A.E. and Anadon, R. 1994. A comparison of pathological changes caused by *Vibrio anguillarum* and its extracellular products in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Pathology 29, 79–89. DOI: 10.3147/jsfp.29.79

Lange S., Alister W.D. e Bergljót M. 2004a. Isolation and characterization of complement component C3 from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Fish & Shellfish Immunology,* 16:227-239. DOI: 10.1016/S1050-4648(03)00081-0

Lange S, Bambir S, Dodds A, Magnadottir B. 2004 b. An immunohistochemical study on complement component C3 in juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Dev Comp Immunol 2004;28:593–601. DOI : 10.1016/j.dci.2003.10.006

Lange S, Bambir S, Dodds A, Magnadottir B. 2004 c. The ontogeny of complement component C3 in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): an immunohistochemical study. Fish Shellfish Immunol 16, 359–67. DOI:10.1016/j.fsi.2003.06.001

Larsen J.L. y Pedersen K. (1997) Vaccination strategies in freshwater salmonid aquaculture. En: *Fish Vaccinology* (ed. by R. Gudding, A. Lillehaug, P.J. Mydtlying & F. Brown). *Develop. Biol. Stand.* 90, 391–400.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Lee, K.K.,Ellis,A.E., 1990 .Glycerophospholipid:cholesterol acyltransferase complexed with lipopolysaccharide (LPS) is a major lethal exotoxin and cytolysin of *Aeromonas salmonicida*: LPS stabilizes and enhances toxicity of the enzyme. J. Bacteriol 172 (9), 5382-5393. DOI: 10.1128/jb.172.9.5382-393.1990.

Leiro, J., Iglesias, R., Paramá, A., Sanmartın, M.L, Ubeira, F.M. 2001. Effect of *Tetramicra brevifilum* (Microspora) infection on respiratory-burst responses of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) phagocytes. Fish Shellfish Immunol, 11, 639-652. DOI: 10.1006/fsim.2001.0340

Leiro J., Arranz, J.A., Iglesias, R., Ubeira, F.M., .Sanmartín, M.L. 2004. Effects of the histiophagous ciliate *Philasterides dicentrarchi* on turbot phagocyte responses. Fish & Shellfish Immunol. 17 (1), 27-39. DOI : 10.1016/j.fsi.2003.11.003

Lillehaug A, Lunestad BT, Grave K. 2003. Epidemiology of bacterial diseases in Norwegian aquaculture — a description based on antibiotic prescription data for the ten-year period 1991 to 2000. Dis Aquat Org 53 (2),115–125. DOI:10.3354/dao053115

Livesley,M.A., Smith,S.N., Armstrong,R.A., Barker,G.A, 1999. Characterization of *Aeromonas* strains and species by pulsed field electrophoresis and principal component analysis. 22 (5), 369-375.DOI: 10.1046/j.1365-2761.1999.00186.x

Logambal, SM, Venkatalakshmi, S, Dinakaran Michael, RD. Immunostimulatory effect of leaf extract of *Ocimum sanctum* Linn in *Oreochromis mossambicus* (Peters) *Hydrobiologia*. 2000;430:113–120. DOI : 10.1023/A:1004029332114

Lovoll M, Kilvik T, Boshra H, Bogwald J, Sunyer JO, Dalmo

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

RA.2006. Maternal transfer of complement components C3-1, C3-3, C3-4, C4, C5, C7, Bf, and Df to offspring in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Immunogenetics 58,168-179, DOI:10.1007/s00251-006-0096-3

Lund.V., Jorgenses, T., . Holm,K.O., Oeufs,G., 1991 Humoral immune response in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., to cellular and extracellular antigens of *Aeromonas salmonicida,* J. Fis Dis 14, 443-452 DOI: 10.1111/j.1365-2761.1991.tb00596.x.

Lund V, Espelid S, Mikkelsen H (2003) Vaccine efficacy in spotted wolffish *Anarhichas minor*: relationship to molecular variation in A-layer protein of atypical *Aeromonas salmonicida.* Dis Aquat Org 56: 31−42. DOI: I:10.3354/dao056031

Ma J, Bruce TJ, Jones EM, Cain KD (2019) A review of fish vaccine development strategies: conventional methods and modern biotechnological approaches. Microorganisms 7(11), 569. DOI: 10. 3390/ microorgan isms7 110569.

Mac Faddin; 1993. Pruebas Bioquímicas para la identificación de Bacterias de Importancia Clinica.2nd Ed. Editorial Médica Panamericana S.A.

MacIntyre, S., Trust, T. J., Buckley, J. T., 1980. Identification and characterization of outer membrane fragments released by *Aeromonas sp*. Can J Biochem 58(10) .Doi: 10.1139/o80-138.

McNulty, S., Klesius, P.H., and Shoemak, C.A.2003. Hematological Changes in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Infected with *Streptococcus iniae* by Nare Inoculation. J World Aquac. Soc. 34 (3), 418-422.

Magnadóttir,B., 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Shellfish Inmunol, 20(2):137-151 DOI: 10.1016/j.fsi.2004.09.006.

Magariños B; Romalde JL; Santos Y; Casal JF; Barja JL; Toranzo AE. 1994.Vaccination trials on gilthead seabream (*Sparus aurata*) against *Pasteurella piscicida*. Aquaculture 120 (3-4), 201-208. DOI:10.1016/0044-8486(94)90078-7

Magariños,B., Devesa,S., González,A., CastroN., Toranzo,A.E., 2011. Furunculosis in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) cultured in a recirculation system. Vet. Record 168(16):431b DOI:10.1136/vr.c6754

Martins, M.L., Tavares-Dias, M, Fujimoto, R.Y., Onaka, E.M.,. Nomura, D.T. 2004. Haematological alterations of *Leporinus macrocephalus* (Osteichthyes*:* Anostomidae) naturally infected by *Goezia leporine* (Nematoda: Anisakidae) in fishpond. Arq. Bras. Med. Vet. Zootecnia., 56 (2004), pp. 640-646

Martins, M.L., Pedreira Mouriño, J.L., Amaral G.V., do Nascimento F. 2008. Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. Brazilian J. Biol 68(3), 657-661. DOI:10.1590/S1519-69842008000300025

Martínez-Murcia A.J, Benlloch S., Collins M.D. 1992 Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. Int J Syst Microbiol 42:412-421

Menanteau-Ledouble,S., Kumar,G., Saleh,M., El-Matbouli,M., 2016. *Aeromonas salmonicida:* updates on an old acquaintance, Dis Aquat Org. 120, 49-68 DOI: 10.3354/dao03006.

Midtlyng PJ, Reitan LJ, Lillehaug A, Ramstad A. 1996a. Protection,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

immune responses, and side effects in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) vaccinated against furunculosis by different procedures. Fish Shellfish Immunol 6:599–613-

Midtlyng PJ, Reitan LJ, Speilberg L (1996b) Experimental studies on the efficacy and side-effects of intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. Fish Shellfish Immunol 6:335–350

Midtlyng PJ, Lillehaug A (1998) Growth of Atlantic salmon *Salmo salar* after intraperitoneal administration of vaccines containing adjuvants. Dis Aquat Org 32:91–97. DOI: 10.3354/dao032091

Miyata,M., Aoki,T., Inglis,V., Yoshida,T., Endo,M., 1995. Analyse RAPD of *Aeromonas salmonicida et Aeromonas hydrophila*. J. Appl Microbiol 79(2), 181-185. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1995.tb00933.x

Mondal, H., Thomas, J. 2022. A review on the recent advances and application of vaccines against fish pathogens in aquaculture. Aquaculture Int. 30, 1971-2000. DOI: 10.1007/s10499-022-00884-w

Moyner K (1993) Changes in serum protein composition occur in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., during *Aeromonas salmonicida* infection. J. Fish Dis. 16, 601-604. DOI: 10.1111/j.1365-2761.1993.tb00897.

Mutoloki,S, Munang'andu,H.M and Evensen.Ø. 2015. Oral Vaccination of Fish – Antigen Preparations, Uptake, and Immune Induction. Front Immunol. 6: 519. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00519

Nadiro, V.N., Puspitasari, I., Setyastudi, T.A, Santika, A. 2020. Hematological parameters of Catfish (*Clarias* sp) vaccinated by *Aeromonas hydrophila* with different application methods. IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 441 012082. DOI:10.1088/1755-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1315/441/1/012082

Najimi ,M., Lemos , M.L. Osorio, C.R. 2008 a. Identification of siderophore biosynthesis genes essential for the growth of *Aeromonas salmonicida* under iron-limiting conditions J. Appl. Environ. Microbiol..74 (8) , 2341-2348. DOI : 10.1128/AEM.02728-07.

Najimi ,M., Lemos , M.L. Osorio, C.R.2008 b. Identification of heme absorption genes in the fish pathogen *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida*, Vet. Microbiol 133(4), 377-382 .DOI: 10.1016/j.vetmic.2008.07.008.

Nakao M, Mutsuro J, Obo R, Fujiki K, Nonaka M, Yano T. 2000. Molecular cloning and protein analysis of divergent forms of the complement component C3 from a bony fish, the common carp (*Cyprinus carpio*): presence of variants lacking the catalytic histidine. European J. Immunol. 30, 858–866

Nielsen B, Olsen JE, Larsen JL1994. Restriction endonuclease analysis (REA) and ribotyping of *Aeromonas salmonicida*. Dis. Aquat. Org., 18, 155- 158.

Nielsen, M. E., Esteve-Gassent, M. D., 2006 The eel immune system: present knowledge and the need for research. J Fish Dis 29 (2), 65-128 DOI:10.1111/j.1365-2761.2 006.00695.x

Noia, M., Dominguez, B., Leiro, J., Blanco-Mendez, J., Luzardo-Alvarez, A., Lamas, J. 2014. Inflammatory responses and side effects generated by several adjuvant containing vaccines in turbot. Fish Shellfish Immunol. 38,244-254. DOI: 10.1016/j.fsi.2014.03.020

Nomura , S., Fujino , M., Yamakawa ,M., Kawahara,E., 1988. Purification and characterization of salmolysin, an extracellular hemolytic toxin of *Aeromonas salmonicida* . J Bacteriol 170(8), 3694-3702. DOI : 10.1128/jb.170.8.3694-3702.1988.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Ortega,C., O. Gimeno.O., Banc.V., Cortes.P., Anai.S., Llagostera, M., 2006 Antibiotic susceptibility of strains of *Aeromonas salmonicida* isolated from spanish salmonids Rev. Méd. Vét. 157 (8-9), 410-414.

O´hici, B, Olivier, G., Powell,.R., 2000. Genetic diversity of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* demonstrated by random amplified polymorphic DNA and pulsed-field gel electrophoresis analyses. Dis Aquat Org. 39, 109-119. DOI:10.3354/dao039109

Palm RC Jr, Landolt ML, Busch RA (1998) Route of vaccine administration: effects on the specific humoral response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dis Aquat Org 33:157–166. DOI: 10.3354/dao033157.

Pavan ,M.E., Abbott ,S.L., Zorzópulos ,J., Janda,J.M., 2000. *Aeromonas salmonicida subsp. pectinolytica subsp. nov*., a new subspecies positive for pectinase isolated from a heavily polluted river. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50, 1119–1124 .Doi: 10.1099/00207713-50-3-1119

Pedersen, K. and Larsen, J.L. (1993) rRNA gene restriction patterns of *Vibrio anguillarurn* serogroup 01. Dis Aquat Org 16:121-126

Penagos, GMV; Barato P , MV; Iregui C. 2008. Sistema inmune y vacunación de peces. Acta biol. Colomb., Vol. 13 No. 3, 2008 3 - 26

Pichavant, K., Maxime, V., Soulier, P., Gilles B. 2003. A comparative study of blood oxygen transport in turbot and sea bass: Effect of chronic hypoxia. J. Fish Biol 62(4), 928 – 937. DOI:10.1046/j.1095-8649.2003.00089.x7

Poppe TT, Breck O (1997) Pathology of Atlantic salmon *Salmo salar* intraperitoneally immunized with oil-adjuvated vaccine. A case report. Dis Aquat Org 29:219–226. DOI:10.3354/dao029219

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Powell MD, James O. Harris1, Jeremy Carson2, Jonathan V. Hill. 2005. Effects of gill abrasion and experimental infection with *Tenacibaculum maritimum* on the respiratory physiology of Atlantic salmon *Salmo salar* affected by amoebic gill disease. Dis Aquat Org 63, 169-174. DOI:10.3354/dao063169

Power, E.G.M. 1996. RAPD typing in microbiology- a technical review. J. Hospital Infect 34, 247-265.

Price ,N.C., Stevens, L., Duncand,D., Snodgrass, M., 1989 Proteases secreted by strains of *Aeromonas salmonicida* J. Fiish Dis 12 (3), 223-232. DOI: 10.1111/j.13652761.1989.tb00306.x

Pulido E, Iregui C, Figueroa J, Klesius P. 2004. Estreptococosis en tilapias (*Oreochromis* spp.) cultivadas en Colombia. Revista AquaTIC. 20:97-106.

Rasch, M., Kastbjerg, V.G., Bruhn, J.B., Dalsgaard, I., Givskov, M., Gram, L., 2007. Quorum sensing signals are produced by *Aeromonas salmonicida* and quorum sensing inhibitors can reduce production of a potential virulence factor. Dis. Aquat. Organ. 78, 105–113. doi: 10.3354/dao01865

Rauta, P.R., Nayak, B., Das, S. 2012. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms. Immunol Letters 148 (1), 23-33. DOI: 10.1016/j.imlet.2012.08.003

Real, F., Acosta, B., Déniz,S., Oros, J., Rodriguez, E., 1994. *Aeromonas salmonicida* infection in *Sparus aurata* in the Canaries. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., 14 (1994), pp. 153-155.

Reith ,M.E., Singh,R.K., Curtis,B., Boyd ,J.M., Bouévitch ,A., Kimball,J., Munholland ,J., Murphy,C., Darren Sarty ,D.,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Williams ,J., Nash,J.HE., Stewart,C., Johnson,S.C., Brun, L.L., 2008. The genome of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449: an overview of the evolution of a fish pathogen. BMC Genomics 9, 427 (2008). https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-427

Reglamento (UE) 2019/6 del parlamento europeo y del consejo de 11 de diciembre de 2018 sobre medicamentos veterinarios y por el que se deroga la Directiva 2001/82/CE. Diario Oficial de la Unión Europea L 4/43, 7.1.2019

Rehulka, J., Minarik, B., Řehulková, E. 2004. Red blood cell indices of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in aquaculture. Aquaculture res. 35(6), 529-546. DOI:10.1111/j.1365-2109.2004.01035.x

Rockey, D. D., Fryer, J. L., Rohovec, J. S. (1988). Separation and in vivo analysis of two extracellular proteases and the T-haemolysin from *Aeromonas salmonjcida*. Dis. aquat. Org. 5, 197-204

Romstad,A.B., Reitan,L.J., Midtlyng,P., Gravningen,K., Evensen,Ø., 2012. Development of an antibody ELISA for potency testing of furunculosis (*Aeromonas salmonicida* subsp *salmonicida*) vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L) Biologicals 40 (1), 67-71. DOI: /10.1016/j.biologicals.2011.09.011

Rombout J.H.W.M., van den Berg A.A., van den Berg C.T.G.A., Witte P. & Egberts E. (1989) Immunological importance of the second gut segment of carp. III. Systemic and/or mucosal immune response after immunization with soluble or particulate antigen. *J. Fish Biol* 35, 179–186.DOI: 10.1111/j.1095-8649.1989.tb02967.x

Salati, F., Kawai, K, and Kusuda, R.1984.Immune Response of Eel to *Edwardsiella tarda* Lipopolysaccharide. Fish Pathology 19(3),187-192.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Santarém, M.; Novoa, B. y Figueras, A. (1997). Effects of β-glucans on the non-specific immune responses of turbot *(Scophthalmus maximus L.). Fish & Shellfish Immunol.* 7, 429-437.

Santos Y. 2005. Principales enfermedades bacterianas en la piscicultura ibérica: diagnóstico y vacunación. En: Chaves Pozo, E., García Ayala, A., Meseguer Peñalver, Eds Editorial Carbonell Arias, José Maria. Inmunología e Inmunopatología en piscicultura. pp. 127 - 153.

Santos, Y. 1991. Factores de virulencia y características antigénicas de *Vibrio anguillarum* y *Aeromonas* móviles. Tesis Doctoral, Universidade de Santiago de Compostela.

Santos,Y., Lallier, R., Bandín, I., Lamas, J., Toranzo A.E., 1991a. Susceptibility of turbot (*Scophthalmus maximus*), coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and rainbow trout (*0. mykiss*) to the strains of *Vibrio anguillarum* and their exotoxins, J. Appl. Ichthyol., 7 pp. 160-167.DOI : 10.1111/j.1439-0426.1991.tb00522.x

Santos Y; Bandín I; Nieto TP; Barja JL; Toranzo AE; Ellis AE. 1991b. Cell-surface-associated properties of fish pathogenic bacteria. J. Aquatic Anim Health. 3(4), 297-301 DOI: 10.1577/1548-8667(1991)003<0297:CSAPOF>2.3.CO;2

Santos Y; Bandín I; Núñez S.; Gravningen K; Toranzo AE. 1991c. Protection of turbot, *Scophthalmus-maximu*s, and rainbow-trout, *Oncorhynchus mykiss* (Richardson), against vibriosis using two different vaccines.J. Fish Dis 14 (3), 407- 411. DOI: 10.1111/j.1365-2761.1991.tb00840.x

Santos,Y., Romalde,JL., Bandin,I., Magarinos,B., Nunez,S., 1993. Usefulness of the API-20E system for the identification of bacterial fish pathogens, - Aquaculture, 116 (2-3), 111-120 DOI:

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

10.1016/0044-8486(93)90002-G

Santos, Y., Pazos, F., Bandin, I. y Toranzo, A. E. 1995. Analysis of antigens present in the extracellular products and cell surface of *Vibrio anguillarum* Serotypes O1, O2 and O3. Appl. Environ. Microbiol., 61: 2493–2498. DOI: 10.1128/aem.61.7.2493-2498.1995

Secombes, C.J. and Wang, T. 2012. The innate and adaptive immune system of fish. Páginas : 3-68. En : Infectious Disesaes in aquaculture. Prevention and control (Austin B. Ed) Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. DOI: 10.1533/9780857095732.1.3

Seibel, H., Baβman B. and Rebl, A. 2021. Blood Will Tell: What Hematological Analyses Can Reveal About Fish Welfare. Front Vet Sci. 8 : 616955. DOI: 10.3389/fvets.2021.616955

Scapigliati, G., Romano, N. y Abelli, L. 1999. Monoclonal antibodies in fish immunology: identification, ontogeny, and activity of T- and B-lymphocytes. *Aquaculture*, 172(1-2):3-28. .DOI: 10.1016/S0044-8486(98)00440-2

Schmidtke,L.M, Carson,J., 1999. Induction, characterization, and pathogenicity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) of L-forms of Lactococcus garvieae. Vet Microbiol 69 (4), 287-300.Doi: 10.1016/S0378-1135(99)00120-0

Schmidtke, L.M. y Carson, J. 2003. Antigen recognition by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) of whole cell proteins expressed by *Lactococcus garvieae* when obtained directly from fish and under iron limited culture condition. Vet Microbiol, 93(1):63-71. DOI: 10.1016/s0378-1135(02)00440-6.

Schulz,P., Terech-Majewska, E., Siwicki, A.K., Kazuń, B, Demska-Zakęś, K ; Rożyński, M, and Zakęś, Z.2020. Effect of

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Different Routes of Vaccination against *Aeromonas salmonicida* on Rearing Indicators and Survival after an Experimental Challenge of Pikeperch (*Sander lucioperca*) in Controlled Rearing. Vaccines 8(3), 476. DOI: 10.3390/vaccines8030476

Siwicki, A, and Studnicka, M. 1987. The phagocytic ability of neutrophils and serum lysozyme activity in experimentally infected carp, *Cyprinus carpio* L. J. Fish Biol 31, 57-60. DOI: 10.1111/j.1095-8649.1987.tb05293.x

Sitjà-Bobadilla, A.; Mingarro, M.; Pujalte, M.J.; Garay, E.; Alvarez-Pellitero, P.; Pérez-Sánchez, J.2003. Immunological and pathological status of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) under different long-term feeding regimes. *Aquac.*220,707-724.

Sitjà-Bobadilla, A.; Redondo, MJ, Bermúdez, R., Palenzuela, O, Ferreiro, I, Riaza, A, Quiroga, I, Nieto, JM, Alvarez-Pellitero, P. 2006. Innate and adaptive immune responses of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), following experimental infection with *Enteromyxum scophthalmi* (Myxosporea: Myxozoa). Fish & shellfish immunol. 21 (5), 485-500. DOI: 10.1016/j.fsi.2006.02.004

Sitjà-Bobadilla, A.; Palenzuela, O. y Alvarez-Pellitero, P. 2008. Immune response of turbot, *Psetta maxima* (L.) (Pisces: Teleostei), to formalin-killed scuticociliates (*Ciliophora*) and adjuvanted formulations. *Fish & Shellfish immunol.* 24(1):1-10. DOI: 10.1016/j.fsi.2007.06.007

Snieszko, S.F., , y Friddle, S.B. 1949. Prophylaxis of Furunculosis in Brook Trout (Salvelinus Fontinalis) by Oral Immunization and Sulfamerazine. Progress. Fish Culturist 11(3), 1949. DOI: 10.1577/1548-8640(1949)11[161:POFIBT]2.0.CO;2

Sørum U, Damsgård B (2004) Effects of anaesthetization and

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

vaccination on feed intake and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture 232:333–341. DOI : DOI:10.1016/S0044-8486(03)00529-5

Stasiak S., Baumann, S. 1996. Neutrophil activity as a potential bioindicator for contaminant analysis. Fish Shellfish Immunol 6 (7), 537-539.DOI : 10.1006/fsim.1996.0050

Sukenda, S., Rahman, R., Nisaa, K., Hidayatullah, D. 2018. The efficacy of *Streptococcus agalactiae* vaccine preparations, administered to tilapia broodstock, in preventing streptococcosis in their offspring, via transfer of maternal immunity. Aquaculture Internat.26, 785-798. DOI: 10.1007/s10499-018-0252-4

Sunyer J.O., Zarkadis K.I., Sahu A. e Lambris D.J., 1996. Multiple forms of complement C3 in trout that differs in binding to complement activators. *Proceed Nat. Acad. Sci USA (Washington, DC),* 93:8546-8551.

Sunyer J.O., Tort L., Lambris D.J. 1997. Diversity of the third form of complement, C3, in fish: functional characterization of five forms on C3 en the diploid fish *Sparus aurata.* Biochem. J. 326 (3),877-881. DOI: 10.1042/bj3260877

Sunyer J.O., Tort L., Lambris D.J. 1998. Evolution and diversity of the complement system of poikilothermic vertebrates. Immunol. Rev.166:39-57. DOI: 10.1111/j.1600-065X.1998.tb01251.x

Sunyer J.O.,Lorenzo., G., Parra, D, Boshra H. 2003. Evolution of Complement as an Effector System in Innate and Adaptive Immunity. Immunol Res 27(2-3):549-64 DOI:10.1385/IR:27:2-3:549

Swift, S., Karlyshev, A.V., Fish, L., Durant, E.L., Winson, M.K., Chhabra, S.R., Williams, P., Macintyre, S., Stewart, G.S., 1997. Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

salmonicida: identification of the LuxRI homologs AhyRI and AsaRI and their cognate N-acylhomoserine lactone signal molecules. J. Bacteriol. 179, 5271–5281

Tafalla, C. y Novoa, B. 2000. Requirements for nitric oxide production by turbot (*Scophthalmus maximus*) head kidney macrophages. Develop. Comp Immunol, 24(6-7), 623-631. DOI : 10.1016/s0145-305x(99)00087-7.

Tajima, K. Takahashi, T. Ezura.y & kimura, T. 1983. Studies on the virulent factors produced by *Aeromonas salmonicida,* causative agent of furunculosis in salmonidae.II.studies on the pathogenicity of the protease of *Aeromonas salmonicida* Ar-4 (EFDL) on yamabe (*Oncorhynchus masou f ishikawai*) and gold fish *(Carassius auratus*), and the substance which exhibit xic effect on RTG-2 (raimbow trout gonad) cells. Bull faculty fishries, Hokkaido University 34:111-123.

Titball, R, W, & Munn, C, B; 1983, Partial purification and properties of a haemolytic activity (T-lysin) from *Aeromonas salmonicida*. FEMS Microbiol. Letters 20, 207-210

Titball, R, W , & Munn, C, B. 1985.The purification and some properties of H-lysin from *Aeromonas salmonicida* .J Gen Microbiol 131,1603-1609.

Titball, R.W., Bell, A., Munn C.B., 1985. Role of caseinase from *Aeromonas salmonicida* in activation of hemolysin Infect Immun. 49(3),.756-759. DOI: 10.1128/iai.49.3.756-759.1985

Thornton , J.C., Garduño , R.A., Carlos , S.J., Kay, W.W., 1993. Novel antigens expressed by *Aeromonas salmonicida* grown in vivo. Infec Immun 61(11),4582-4589. DOI: 10.1128/iai.61.11.4582-4589.

Toranzo, A, E. Santos, Y. Núñez, S. Barja, J, L; 1991, Biochemical

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

and serological characteristics, drug resistence and plasmid prolfiles of Spanish isolates of *Aeromonas salmonicida*, Gyobyo Kenkyu. 26.(2), 55-60.

Toranzo A E; Santos Y, Barja J.L. 1997. En: R. Gudding, A. Lillehaug, P. J. Midtlying, F. Brown, Eds. Immunization with bacterial antigens: *Vibrio* infections. Fish Vaccinology. Developpments in Biologicals, 90: 93 - 105. Karger. Alemania.

Toranzo, A.E., Magariños, B., Romalde, J.L., 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. Aquaculture 246, 37–61. Doi:10.1016/j.aquaculture.2005.01.002

Toranzo A, Romalde J, Magarinos B, Barja J (2009) Present and future of aquaculture vaccines against fsh bacterial diseases. En: Rogers C, Basurco B (eds). The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture. CIHEAM Opt Méditerranéennes 86:155–176

Torres-Corral Y, Girons A., González-Barreiro O., Seoane R., Riaza A., and Santos Y. 2020. Effect of bivalent vaccines against *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas salmonicida* subspecie *achromogenes* on health and survival of turbot. Vaccines 9 (8), 906. DOI: 10.3390/vaccines9080906.

Tort, L., Balasch, J.C. y Mackenzie, S. 2003. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. Inmunología, 22(3), 277-286. DOI: 10.1016/j.dci.2011.07.002

Tsai, C. M., and C. E. Frasch. 1982. Staining of lipopolysaccharide in SDS polyacrylamide gels using silver-staining method. Anal. Biochem. 119, 115– 119. DOI : 10.1016/0003-2697(82)90673-x.

Van den Berg C.W. 2000. Purification of complement components, regulators, and receptors by classical methods. Met. Mol Biol, 150,15-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

52. DOI: 10.1385/1-59259-056-X:15

Vanden-Bergh, P., Heller, M., Braga-Lagache.S, Frey. J. 2013.The *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida* exoproteome: global analysis, moonlighting proteins, and putative antigens for vaccination against furunculosis Proteome Sci 11(1). 44. doi: 10.1186/1477-5956-11-44.

Velji, M.I., Albright, L.J., Evelyn T.P.T. 1992. Immunogenicity of various *Vibrio ordalii* lipopolysaccharide fractions in coho salmon *Oncorhynch us kisutch.*Dis Aquat Org 17, 97-101.

Villamil L., Figueras A., Novoa B. 2003. Immunomodulatory effects of Nisin in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Fish Shellfish Immunol 14(2), 157-169 DOI:10.1006/fsim.2002.0425

Villumsen,K.R., Dalsgaard,I., , Holten-Andersen,L., Raida,M.K., 2012. Potential Role of Specific Antibodies as Important Vaccine Induced Protective Mechanism against *Aeromonas salmonicida* in Rainbow Trout. PLOS ONE 7(11), 10.1371. DOI:10.1371/journal.pone.0046733

Ward, P.D., Waters, C.A. and Sweeney, K.J. 1985. Autoaggregation of virulent *Aeromonas salmonicida* strain lacking additional surface layer. In: Fish and Shellfish Pathology. pp. 107-117. A.E. Ellis (Editor), Academic Press, London.

Watts, M., Munday, B.L. y Burke, C.M. 2001. Inmune Response of Teleost Fish. Australian Vet J, 8, 570-574. DOI: 10.1111/j.1751-0813.2001.tb10753.x

Wang, Z., Zhang, S., Tong, Z., Li, L., and Wang, G. 2009. Maternal transfer and protective role of the alternative complement components in zebrafish Danio rerio. PLoS One. 4(2):e4498. DOI:

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

10.1371/journal.pone.0004498

Wang, J., Lu, D-Q, Jiang, B., Mo, X-B, Du, J.J., Li,A-x. 2020.,Influence of temperature on the vaccine efficacy against *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) Aquaculture 521734943. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2020.734943

Yanong, R.P.E. and Erlacher-Reid, C.. 2012. Biosecurity in Aquaculture, Part 1: An Overview. Southern Regional Aquaculture Center. Publication 4707.

Zou, J.; Secombes, C.J. 2011.Teleost fish interferons and their role in immunity. Dev. Comp. Immunol. 2011, 35, 1376–1387. DOI: 10.1016/j.dci.2011.07.001

Zou, J., Secombes, C.J., 2016. The Function of Fish Cytokines.*Biology* 2016, *5*(2), 23; DOI: 10.3390/biology5020023

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

La forunculosis, causada por *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, es una enfermedad bacteriana que afecta a peces salmónidos y no salmónidos a nivel mundial. La bacteria puede penetrar en los peces a través de las lesiones en la piel, branquias y del epitelio intestinal, causando septicemia hemorrágica, con elevadas mortalidades o produciendo lesiones ulcerativas que reducen la calidad del pescado y dificultan su comercialización. El objetivo de este proyecto es realizar un estudio comparativo de cepas de *A. salmonicida* subespecie *salmonicida* aisladas de diferentes especies de peces y evaluar sus mecanismos de interacción con el hospedador con el fin de establecer medidas de prevención y/o control eficaces que contribuyan a mejorar la rentabilidad del sector de cultivos de peces.